HAL
open science

Distribution nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide au Niger : effets sur les anophèles vecteurs

Cyrille Czeher

To cite this version:

Cyrille Czeher. Distribution nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide au Niger : effets sur les anophèles vecteurs. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2010. Français. NNT : . tel-00581836

HAL Id: tel-00581836

https://theses.hal.science/tel-00581836v1

Submitted on 31 Mar 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE VERSAILLES-SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES
UFR DES SCIENCES
ÉCOLE DOCTORALE "DES GÉNOMES AUX ORGANISMES"

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Entomologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Cyrille CZEHER

Distribution nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide au Niger : effets sur les anophèles vecteurs

Membres du jury

Président
Jean-Luc VAYSSIÈRE, PhD, HDR, Professeur des Universités, Université de Versailles
Rapporteurs
Anna-Bella FAILLOUX-MANUELLAN, PhD, HDR, Institut Pasteur
Vincent ROBERT, PhD, HDR, Directeur de Recherches, Institut de Recherche pour le Développement
Examinateur
Kenneth VERNICK, PhD, Institut Pasteur
Directeur de thèse
Jean-Bernard DUCHEMIN, MD, PhD, HDR, Institut Pasteur

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Jean-Bernard Duchemin, qui m'a encadré depuis le Master et m'a témoigné sa confiance en me permettant de prendre part au projet de suivi de la distribution nationale de moustiquaires. Merci pour tes conseils, ta gentillesse, ton soutien, les idées de la pause café. Merci de m'avoir fait aimer l'entomologie de terrain, apprécier la beauté de l'anophèle, progresser sur le chemin de l'autonomie, entrevoir les responsabilités du chef d'unité, et échantillonner les larves d'Ingall et Teguidda-n-Tessoumt !

Merci infiniment aux deux rapporteurs, Anna-Bella Failloux et Vincent Robert, qui ont accepté d'évaluer ce travail malgré des agendas toujours bien remplis. Merci également à Jean-Luc Vayssière et Kenneth Vernick d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je souhaite bien sûr remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible et agréable :

Au CERMES, l'équipe du laboratoire d'entomologie qui a travaillé dur à l'échantillonnage, la répertorisation et l'identification morphologique des spécimens, Rabiou "papy" Labbo, Amadou "Hanz" Djibrilla, Ibrahim "Ibrak" Arzika, Tankari Dan Kountche ainsi que les chauffeurs leur ayant fait parcourir le pays en sécurité ; Amadou Djibrilla pour son implication majeure dans les tests ELISA ; Ibrahim Arzika et Gaëlle Vieville pour leur aide précieuse dans les extractions et PCR ; Oumarou Alto pour l'enquête de couverture en moustiquaires ; Isabelle Jeanne pour les données environnementales ; Suzanne Chanteau, alors directrice, et le service administratif et financier, d'avoir permis le bon déroulement de ces belles années parmi vous.

Au Pharo, Christophe Rogier pour son accueil au sein de l'unité de recherche sur la biologie et l'épidémiologie du paludisme et Hervé Bogreau pour m'avoir formé aux électrophorèses capillaires et révélé les mystères du fluorochrome.

A l'Institut Pasteur, Sylvain Brisse et Laure Diancourt de la PF8, pour toujours plus de génotypages microsatellites ; Geneviève Milon pour avoir facilité la rédaction de cette thèse en me permettant l'accès à la médiathèque.

Merci à Stefan Hoyer de l'Organisation Mondiale de la Santé, détaché auprès de la Fédération Internationale de la Croix Rouge, pour les efforts déployés pour le bon déroulement de l'opération et du suivi, ainsi que pour l'accueil à Genève. Merci également aux membres du comité scientifique, Marcel Hommel, Pierre Carnevale, Jean Roux, Ali Djibo et Socé Fall, pour les commentaires et recommandations lors des comités scientifiques du projet.

Merci au personnel du Programme National de Lutte contre le Paludisme, Ibrahim Ousmane, directeur lors de l'organisation de la distribution, Abani Maazou son successeur et Hadiza Soumaila du service de lutte anti-vectorielle.

Merci au Fond Mondial de lutte contre le Sida, la Tuberculose et le Paludisme ainsi qu'à l'OMS pour le financement de ma bourse de thèse.

J'aurai toujours des pensées reconnaissantes envers Françoise Puel, pour m'avoir inoculé le virus de la parasitologie (pathogène cocasse), et René Houin, directeur de mon stage de Maîtrise, m'ayant rapproché de l'entomologie médicale et permis de passer des collections d'eaux de l'Essonne à celles du Sahel !

Sur un plan plus personnel, merci à toutes les personnes qui ont rendu ce séjour au Niger inoubliable : tous les collègues et amis du CERMES ; les amitiés nées de partages musicaux, tout particulièrement Macaire, Patrick, Masta, Marc, Alex, Ali dodo, Mikaël et Souley ; les amis du quartier plateau, Idé (et ses fameux sandwichs omelette), Zakari, Idi, Mohamed, Maman, Francis, Xavier, Latou ...

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'unité pasteurienne de Génétique et Génomique des Insectes Vecteurs, pour leur accueil chaleureux lors des visites plus ou moins fréquentes à mon directeur, m'ayant permis de rompre régulièrement l'isolement de ces longs mois de rédaction à la maison.

Pour votre soutien de toujours, merci à ma famille, mes amis, ma femme Nathalie et ma belle famille !

A la mémoire de Jules Czeher, Calixte Assogba, Patrick Koménati. Que la terre leur soit légère ...

Pour tout cela, et la suite, sincèrement, merci.

Table des matières

CHAPITRE 1. INTRODUCTION 5

I. INTRODUCTION GENERALE 5

II. CONTEXTE DU PALUDISME EN AFRIQUE ET METHODES DE LUTTE 7

II.1. Transmission du paludisme et implications de santé publique 7

II.1.1. Biologie et épidémiologie du paludisme 7

A/ Généralités 7

B/ Interactions entre hôtes et parasites 8

C/ Contact homme-anophèle et transmission 10

D/ Intensité et distribution de la transmission palustre en Afrique 10

II.1.2. Implications de santé publique 13

II.2. La lutte contre le paludisme 16

II.2.1. Evolution de la lutte contre le paludisme 16

A/ Des débuts de la lutte antipaludique au programme global d'éradication 16

B/ La lutte antipaludique au XXIème Siècle 17

II.2.2. Méthodes et outils de lutte contre le paludisme 19

A/ La lutte anti-vectorielle 19

B/ La lutte contre la transmission 22

C/ Utilisation des moustiquaires non imprégnées 24

D/ La moustiquaire imprégnée d'insecticide : modes d'action et utilisations 25

E/ Limites de la lutte chimique et résistance aux insecticides 28

F/ Gestion de la résistance et méthodes alternatives de lutte 34

II.2.3. De l'outil au programme de lutte 37

A/ Stratégies de lutte 37

B/ Mise en œuvre et efficacité des programmes opérationnels 39

III. LES VECTEURS DU PALUDISME 44

III.1. Les anophèles vecteurs de la zone Afrotropicale 44

III.1.1. Cycle de vie et bio-écologie 44

III.1.2. Espèces impliquées dans la transmission de *Plasmodium* 45

III.2. Le complexe Anopheles gambiae 47

III.2.1. Composition, distribution et bio-écologie 47

III.2.2. Variabilité génétique et structure des populations 50

A/ Inversions chromosomiques et cytogénétique 50

B/ Outils moléculaires d'étude du complexe gambiae 54

C/ Marqueurs génétiques et structure des populations 61

IV. LE CAS DU NIGER 66
IV.1. Situation éco-climatique et contexte du paludisme 66
IV.1.1. Situation éco-climatique du Niger 66
IV.1.2. Contexte du paludisme 69
A/ Généralités 69
B/ Les vecteurs du paludisme au Niger 71
IV.2. Politique nationale de lutte et mise à l'échelle des nouvelles stratégies 73
IV.2.1. Politique nationale de lutte contre le paludisme 73
IV.2.2. Nouvelles stratégies et mise à l'échelle 73
V. METHODOLOGIE 76
V.1. Aperçu du projet de suivi de la transmission, le projet "OMNI" 76
V.2. Suivi des populations de vecteurs 77
V.2.1. Plan et méthodes d'échantillonnage 77
V.2.2. Méthodes de laboratoire et analyses 80
A/ Caractérisation des populations de vecteurs et de la transmission 81
B/ Résistance d'An. gambiae s.l. aux insecticides 83
C/ Génétique des populations d'An. gambiae s.l. 85

CHAPITRE 2. DISTRIBUTION, COMPORTEMENT ET INFECTION DES VECTEURS 92

I. DESCRIPTION DE LA FAUNE ANOPHELIENNE 92
II. CARACTERISATION DES POPULATIONS D'*AN. GAMBIAE* S.L. 94
II.1. Abondances et comportements d'An. gambiae s.l. 94
II.1.1. Abondances 94
II.1.2. Estimation de l'endophagie et de l'endophilie des échantillons 98
II.1.3. Taux de parturité 101
II.2. Distribution des espèces du complexe Anopheles gambiae 103
III. INFECTION DES VECTEURS 109
III.1. Infection d'An. gambiae s.l. 109
III.2. Infection d'An. funestus 114
IV. SYNTHESE ET DISCUSSION 116

CHAPITRE 3. RESISTANCE AUX INSECTICIDES 126

I. EVIDENCE OF INCREASING LEU-PHE KNOCKDOWN RESISTANCE MUTATION IN *ANOPHELES GAMBIAE* FROM NIGER FOLLOWING A NATIONWIDE LONG-LASTING INSECTICIDE-TREATED NETS IMPLEMENTATION (ARTICLE 1) 127
I.1. Background 130
I.2. Methods 133
I.2.1. Study area 133
I.2.2. Study design and mosquito collections 134
I.2.3. Laboratory processing and data analysis 135
I.3. Results 136

I.3.1. Global results 136
I.3.2. Dynamics of *kdr* frequency in *An. gambiae* M forms 137
I.3.3. Kdr frequency analysis by collection methods 139
I.3.4. Preliminary results for urban M form populations 141
I.4. Discussion 142
I.5. Conclusions 148
II. DONNEES COMPLEMENTAIRES 150
CHAPITRE 4. STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS 156
I. POPULATION STRUCTURE OF *ANOPHELES GAMBIAE* AND *ANOPHELES ARABIENSIS* IN NIGER (ARTICLE 2) 157
I.1. Introduction 160
I.2. Materials and Methods 162
I.2.1. Study sites and mosquito collections 162
I.2.2. LLIN distribution 163
I.2.3. DNA samples 164
I.2.4. Microsatellite markers 164
I.2.5. Data analyses 166
I.3. Results 167
I.3.1. Vector sample sizes by site and subspecies 167
I.3.2. Genetic diversity estimators 168
I.3.3. Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium 170
I.3.4. Spatial genetic structure 171
I.3.5. Temporal genetic structure 173
I.3.6. AMOVA and bayesian-based cluster analyses 174
I.4. Discussion 175
II. DONNEES COMPLEMENTAIRES 181
DISCUSSION GENERALE 189
CONCLUSION, PERSPECTIVES 193
I. CONCLUSION 193
II. PERSPECTIVES 194
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 197
LISTE DES FIGURES 219
LISTE DES TABLEAUX 222
LISTE DES ANNEXES 224
ANNEXES 225

Chapitre 1. Introduction

I. Introduction générale

Cette thèse présente les résultats du suivi des populations anophéliennes du Niger mené dans le cadre d'une distribution de moustiquaires imprégnées à grande échelle, obtenus au cours de trois années passées au Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES) situé à Niamey, capitale du Niger, institut public placé sous la tutelle du ministère de la santé publique du Niger et faisant partie du réseau international des Instituts Pasteur en qualité de centre associé. En décembre 2005, le Niger a accueilli la plus vaste opération de distribution de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes jamais mise en place jusqu'alors (LOEWENBERG 2006). Les financements du Fond Mondial de Lutte contre le Sida, la Tuberculose et le Paludisme, puis de l'OMS, ont permis de mener un suivi-évaluation du déroulement des opérations de distribution, de la possession et de l'utilisation des moustiquaires dans les ménages, ainsi qu'un vaste volet de suivi de la transmission du paludisme et de ses conséquences sur la santé des populations confié au CERMES. Mon travail s'est intégré dans ce projet multidisciplinaire ayant impliqué les unités de parasitologie, d'épidémiologie et l'unité "Santé, Environnement et Climat" du CERMES.

L'objectif général du volet entomologique était d'évaluer les modifications potentielles des populations de moustiques vecteurs de Plasmodies humaines suite à la mise en place des moustiquaires imprégnées dans l'ensemble du pays. Un plan d'échantillonnage a donc

été établi, d'après (1) les conditions éco-climatiques rencontrées sur le territoire nigérien, conditionnant la présence des populations de vecteurs et l'intensité de transmission de *Plasmodium*, ainsi que (2) les caractéristiques de l'intervention, principalement son étendue nationale.

Ce document est scindé en quatre chapitres, articulés autour des articles publiés et en préparation dans le cadre de ce travail :

Le premier chapitre introduit les différentes problématiques abordées, détaille les modalités de la transmission palustre en Afrique et les méthodes de lutte utilisées ou en développement. Il fait ensuite état des connaissances sur le complexe *Anopheles gambiae*, incluant deux des plus importants vecteurs africains, avant de présenter la situation du Niger, puis enfin de détailler la méthodologie employée.

Le deuxième chapitre présente les données (non publiées) de composition, d'abondance, de comportement et d'infection des vecteurs, qui sont ensuite discutées en fin de chapitre.

Le troisième chapitre présente les résultats de l'étude de la mutation *kdr* au sein des échantillons d'*An. gambiae* s.l., en reprenant la forme de la publication, suivis d'une réflexion sur l'influence possible des moustiquaires imprégnées sur les variations temporelles observées.

Dans le quatrième chapitre, les résultats de l'étude de génétique des populations d'*An. gambiae* M et d'*An. arabiensis* à l'aide de marqueurs microsatellites sont exposés, tels qu'acceptés pour publication. Un complément de discussion est ensuite apporté, développant plusieurs hypothèses pour expliquer l'absence de structuration génétique spatiale et temporelle des populations.

Enfin, les différents résultats obtenus sont discutés dans leur ensemble, suivis de perspectives concernant l'étude des vecteurs au Niger et l'avenir de la lutte antipaludique.

II. Contexte du paludisme en Afrique et méthodes de lutte

II.1. Transmission du paludisme et implications de santé publique

II.1.1. Biologie et épidémiologie du paludisme

A/ Généralités

Le paludisme est une affection parasitaire humaine due à des protozoaires du genre *Plasmodium*. Sur une centaine d'espèces plasmodiales actuellement connues, quatre sont responsables du paludisme humain : *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *P. malariae* (Laveran 1881), *P. vivax* (Grassi et Feletti 1890) et *P. ovale* (Stephens 1922). *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus répandue dans toute l'Afrique sub-Saharienne et y cause la majorité des infections palustres graves et mortelles (MOUCHET *et al.* 2004). Même si l'homme est le seul hôte vertébré de *Plasmodium falciparum*, son épidémiologie n'en est pas moins complexe et fait intervenir plusieurs composants : (1) le parasite ; (2) l'homme, hôte intermédiaire ; (3) l'anophèle, hôte définitif et vecteur ; (4) l'environnement biotique et abiotique. Chaque faciès épidémiologique, propre à une région, résulte des interactions entre ces organismes et leur environnement. Le passage du parasite par ses deux hôtes est indispensable à l'accomplissement du cycle de vie complet, où alternent des phases invasives, des phases de multiplication intense, et une phase de reproduction sexuée (Figure 1). Les formes invasives extracellulaires sont le mérozoïte (hépatocyte de l'homme), le sporozoïte (glandes salivaires du moustique), et l'ookinète (lame basale du tube digestif de moustique). Les multiplications asexuées se déroulent dans les hépatocytes et les érythrocytes chez l'homme (schizogonie exo- et endo-érythrocytique) et dans l'oocyste chez le moustique (sporogonie). L'élaboration de moyens de lutte efficaces contre le paludisme

nécessite la connaissance de l'épidémiologie de l'affection ainsi que la biologie du parasite et de ses hôtes, dans différents contextes bio-écologiques.

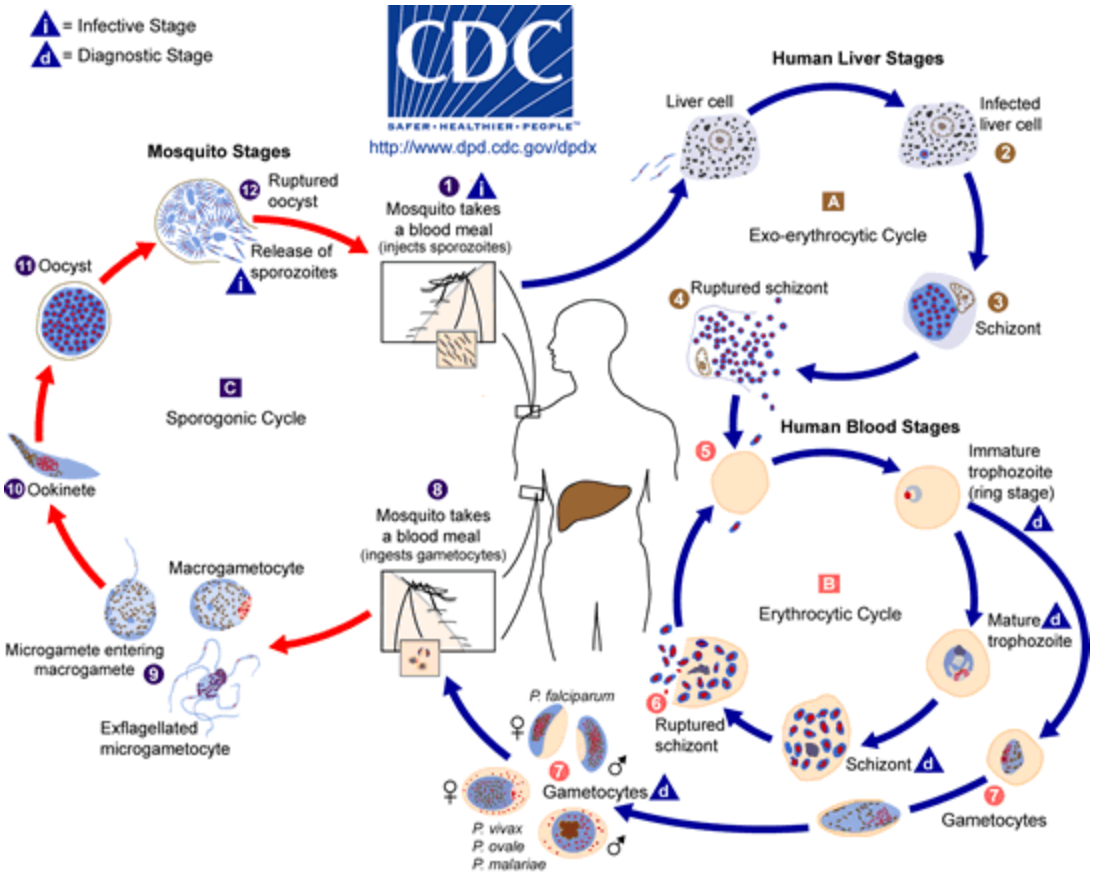


Figure 1. Cycle parasitaire des quatre espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'homme. La phase extrinsèque du cycle dans le moustique est indiquée par les flèches rouge, la phase intrinsèque se déroulant chez l'homme par les flèches bleues (Source : CDC, Atlanta).

B/ Interactions entre hôtes et parasites

Le développement de *P. falciparum* dans son hôte définitif et vecteur est grandement influencé par les conditions environnementales, étant donné que les anophèles sont des organismes poïkilothermes (*i.e.* ne disposant pas de système de régulation de la température corporelle), dont la température interne est par définition proche de la température ambiante. La phase extrinsèque du cycle de *P. falciparum,* depuis le repas de sang infectant l'anophèle jusqu'à l'invasion de son appareil salivaire par les sporozoïtes matures, dure de 9 jours à 30°C jusqu'à 20 jours à 20°C (RODHAIN and PEREZ 1985). Il est

en revanche considéré que le développement extrinsèque de *P. falciparum* est stoppé en dessous de 18°C et au dessus de 35°C. Le gamétocyte, parasite circulant dans le sang ayant subi une différenciation sexuelle, est la forme infectante de *Plasmodium* pour l'anophèle. Ce dernier ne peut s'infecter que s'il ingère des hématies parasitées par au moins un gamétocyte de chaque sexe, permettant ainsi la reproduction sexuée du parasite dans le bol alimentaire aboutissant à la formation d'un zygote (Figure 1). Celui-ci se différencie en ookinète et migre jusqu'à la lame basale de l'épithélium stomacal du moustique, après avoir traversé la membrane péritrophique puis les cellules épithéliales. Après cette migration débute le développement de l'oocyste, siège de la sporogonie (mitoses) après une division méïotique et le retour à l'haploïdie, aboutissant à la formation des milliers de sporozoïtes. Une fois mûr, l'oocyste se disloque et libère les sporozoïtes dans l'hémolymphe du moustique. Une partie des sporozoïtes entrent en contact avec l'épithélium des glandes salivaires et le traversent, pour rejoindre les cellules acineuses produisant la salive, et le canal excréteur de ces glandes, où ils vont achever leur maturation. Dés lors, le moustique est infectant pour les vertébrés réceptifs et il le restera toute sa vie. Un grand nombre de facteurs conditionne la réussite du développement extrinsèque de *P. falciparum*. On peut différencier les facteurs environnementaux (température), les facteurs biologiques liés au moustique (immunité, réceptivité à une souche du parasite donnée, capacité à transmettre par piqûre, durée de vie), et les facteurs biologiques liés au parasite (capacité à infecter une espèce vectrice donnée).

Après l'inoculation par un anophèle infectant d'un petit nombre de sporozoïtes dans un capillaire périphérique de l'homme, le parasite gagne rapidement le foie, et pénètre un hépatocyte où s'effectue la schizogonie, donnant naissance environ dix jours plus tard à de nombreux mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine par l'éclatement de l'hépatocyte parasité (Figure 1). Le mérozoïte pénètre ensuite une hématie par endocytose et se différencie en trophozoïte, qui se développe pour donner à son tour naissance à des mérozoïtes qui vont parasiter d'autres hématies saines après éclatement de l'hématie parasitée. Certains mérozoïtes suivent la voie de la différenciation sexuelle lorsqu'ils

pénètrent leur hématie « hôte » et deviennent des gamétocytes mâles ou femelles. Le cycle est bouclé lorsqu'un anophèle femelle prélève des hématies parasitées par des gamétocytes des deux sexes.

C/ Contact homme-anophèle et transmission

Le degré du contact entre une population humaine et une espèce d'anophèle donnée dépend de nombreux facteurs, pouvant être évalués grâce aux captures et observations de terrain. Les principaux facteurs liés aux populations de moustiques vecteurs sont leur abondance, leur degré d'anthropophilie, leur cycle d'agressivité dans le nycthémère, leur longévité, leur degré d'endo- ou d'exophagie (*i.e.* propension à piquer à l'intérieur / extérieur des habitations), la durée du cycle gonotrophique (durée entre le repas de sang et la ponte). De nombreux facteurs humains et environnementaux rentrent également en compte dont l'abondance, la localisation, et la nature des gîtes larvaires, le mode de vie des populations, le type d'habitation, la localisation des villages, l'utilisation de moyens de protection contre les insectes hématophages, etc ... Les interactions complexes entre les différents composants du système définissent donc localement les modalités de la transmission parasitaire.

D/ Intensité et distribution de la transmission palustre en Afrique

La connaissance de la variabilité de la transmission de *P. falciparum* dans le temps et l'espace est très importante. Les zones et périodes à risque peuvent ainsi être identifiées, les méthodes de contrôle adaptées en conséquence, et les facteurs notamment climatiques, écologiques et démographiques définissant localement le niveau de transmission précisés. L'intensité de la transmission palustre peut être quantifiée de différentes manières. Les principaux indicateurs humains classiquement utilisés sont la prévalence de parasites dans le sang, déterminée par microscopie ou biologie moléculaire, et de rates hypertrophiées. Les indicateurs entomologiques de la transmission sont la prévalence des anophèles femelles présentant des oocystes de *Plasmodium* au niveau de la paroi stomacale, et des sporozoïtes

dans les glandes salivaires. La prévalence de femelles porteuses de sporozoïtes salivaires est un bon indicateur de la proportion de moustiques potentiellement infectants pour l'homme. De plus, le produit de ce taux d'infectivité par le nombre de piqûres reçues permet une estimation du taux d'inoculation entomologique (TIE, ou *Entomological Inoculation Rate*, EIR), exprimé en nombre de piqûres potentiellement infectantes reçues par homme et par unité de temps. Le TIE est un indicateur épidémiologique de l'intensité de transmission parasitaire (SMITH *et al.* 2005; SMITH *et al.* 2001), utilisé dans nombre d'études, dont une méta-analyse récente à l'échelle continentale (KELLY-HOPE and ELLIS MCKENZIE 2009).

La capacité vectorielle (Equation 1) est un indice estimant le nombre d'inoculations secondaires quotidiennes à partir d'une personne infectante (GARRETT-JONES and SHIDRAWI 1969). Elle est déterminée par la densité, le nombre de piqûres sur homme par jour ou *human biting rate* (HBR), le taux de survie journalier des vecteurs, ainsi que la durée du développement parasitaire extrinsèque dans la situation considérée. La notion de capacité vectorielle intègre les paramètres propres au vecteur qui expriment son aptitude à s'infecter, à permettre le développement puis la transmission du parasite, ainsi que tous les facteurs, notamment environnementaux, pouvant moduler ces processus biologiques (RODHAIN and PEREZ 1985).

Equation 1. Capacité vectorielle (C). (D'après Garret-Jones et Shidrawi, 1969)

$$C = \frac{ma^2 p^n}{-\ln p}$$

avec m, densité du vecteur

a, nombre de piqûres sur homme par jour (= HBR)

p, Taux quotidien de survie des vecteurs

n, durée de la phase extrinsèque du cycle parasitaire

Les prévalences parasitaires et indices spléniques chez les enfants ont permis la distinction de plusieurs niveaux de transmission d'intensité croissante : hypo-, méso-, hyper- et holoendémique (METSELAAR and VAN THIEL 1959). Cependant cette classification ne prend pas en compte la composante vectorielle, ni le développement de l'immunité avec l'âge. La notion de faciès épidémiologique a donc été introduite (CARNEVALE *et al.* 1984), prenant en compte les caractéristiques de la transmission parasitaire, le développement de l'immunité ainsi que les manifestations pathologiques du paludisme, propres à différents contextes éco-climatiques. La notion de stabilité temporelle de la transmission est également importante. On distingue le paludisme stable, dont l'intensité de transmission est relativement constante au cours de l'année, du paludisme instable, caractérisé par des variations cycliques du niveau de transmission plus ou moins marquées selon la situation éco-climatique. Le profil de transmission palustre dans une zone donnée découle en grande partie des conditions éco-climatiques et des vecteurs en présence. L'intégration de données environnementales et climatiques dans un modèle mathématique peut donc permettre d'estimer et de cartographier la probabilité de transmission de *P. falciparum*. Le projet MARA/ARMA a ainsi abouti à la création de cartes issues de ce types d'analyses spatiales pour la zone afrotropicale (Figure 2) (MARA/ARMA 1999).

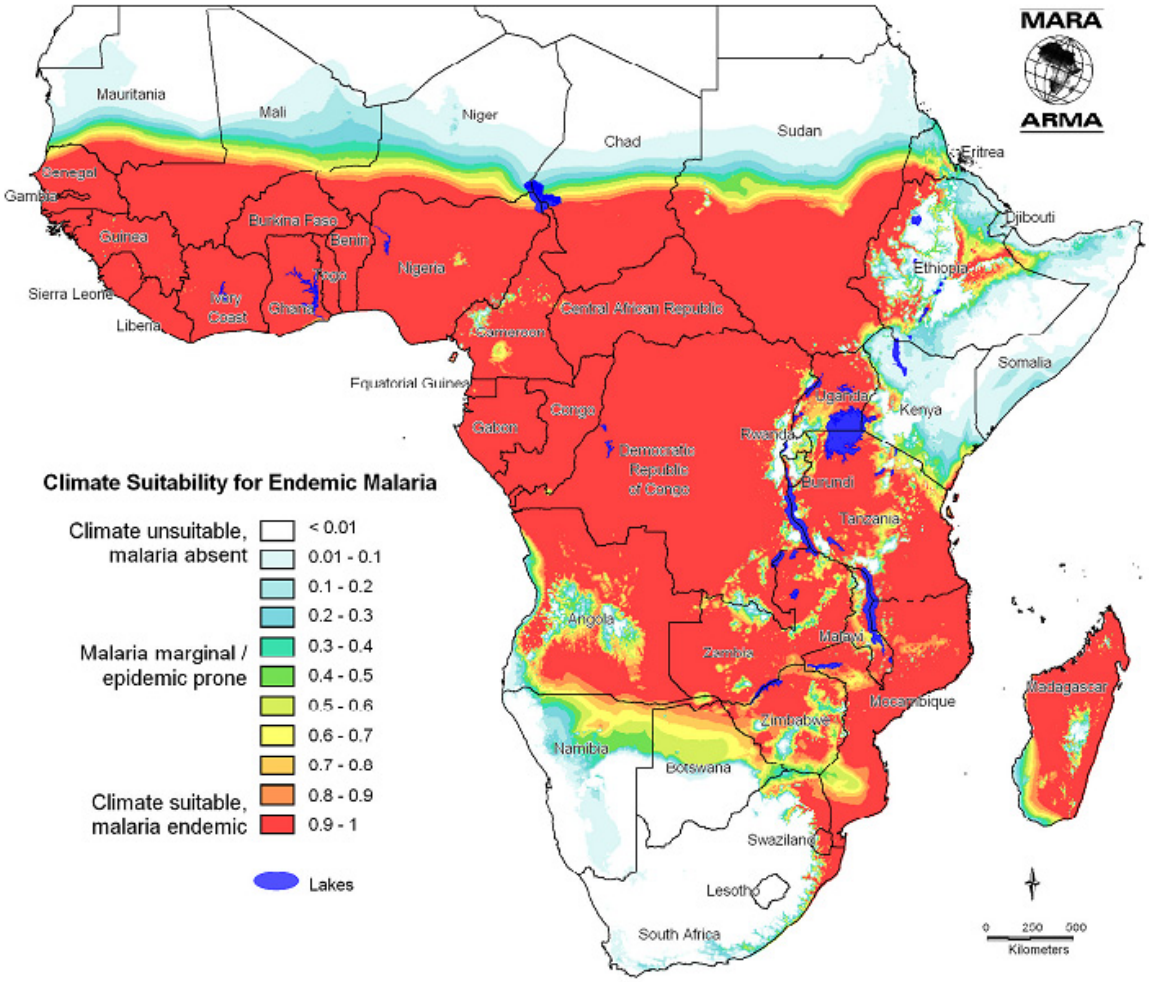


Figure 2. Modèle climatique d'adéquation à la transmission stable du paludisme. Les zones caractérisées par une adéquation proche de 1 sont très propices à une transmission stable, tandis que celles caractérisées par une adéquation nulle ne le sont pas du tout. Il est à noter que le modèle ne discrimine pas les variations d'intensité de transmission au sein de la classe d'adéquation maximale (représentée en rouge) (Source : Projet MARA/ARMA).

II.1.2. Implications de santé publique

La moitié de la population mondiale est exposée au risque de paludisme, et le nombre de cas en 2006 a été estimé entre 190 et 330 millions, dont environ un million de décès (WHO 2008c). Pour la même année, environ 86% des cas estimés sont survenus dans la région afrotropicale, dont une majorité de pays présente des incidences importantes, supérieures à la plupart des autres régions impaludées (Figure 3). De plus, au sein de la région afrotropicale, il a été estimé que 19 des pays les plus peuplés concentrent près de

90% des cas de paludisme (Figure 4), majoritairement dus à *P. falciparum* (WHO 2008c). La grande majorité des décès estimés est également concentrée en Afrique, où le risque de mortalité liée au paludisme est particulièrement élevé et touche principalement les jeunes enfants. Le paludisme est ainsi responsable d'environ 17% des décès d'enfants de moins de cinq ans en Afrique, et constitue donc une des principales causes de mortalité infantile avec les infections respiratoires et les diarrhées (WHO 2008a). L'impact global du paludisme sur les populations a de plus d'importantes conséquences sur le développement socio-économique des pays endémiques, du fait notamment de pertes de productivité et des coût médicaux important engendrés (SACHS and MALANEY 2002).

Concernant les conséquences des interactions entre populations humaines et parasitaires sur la santé, il est important de distinguer le paludisme-infection, état d'une personne hébergeant des parasites quelque soient les manifestations pathologiques associées, du paludisme-maladie, infection entraînant des manifestations pathologiques plus ou moins prononcées. Dans les populations vivant en zone d'endémie, une immunité imparfaite, dite prémunition, se met en place d'autant plus rapidement que la transmission locale est intense et continue. Cependant cette immunité est précaire et instable, et les régions de paludisme instable sont propices à des flambées de cas cliniques au moment de pics de transmission saisonniers. Ces poussées peuvent à l'extrême revêtir un caractère épidémique dans des zones où la transmission est interrompue durant de longues périodes. Une personne immunisée peut héberger des parasites sans pour autant présenter de symptômes, le système immunitaire contrôlant l'infection à un bas niveau, entraînant de faibles charges parasitaires sanguines. Ces porteurs asymptomatiques ont un rôle très important dans l'épidémiologie du paludisme en tant que réservoir du parasite maintenant les foyers de transmission, et permettant la circulation des parasites du fait des déplacements humains.

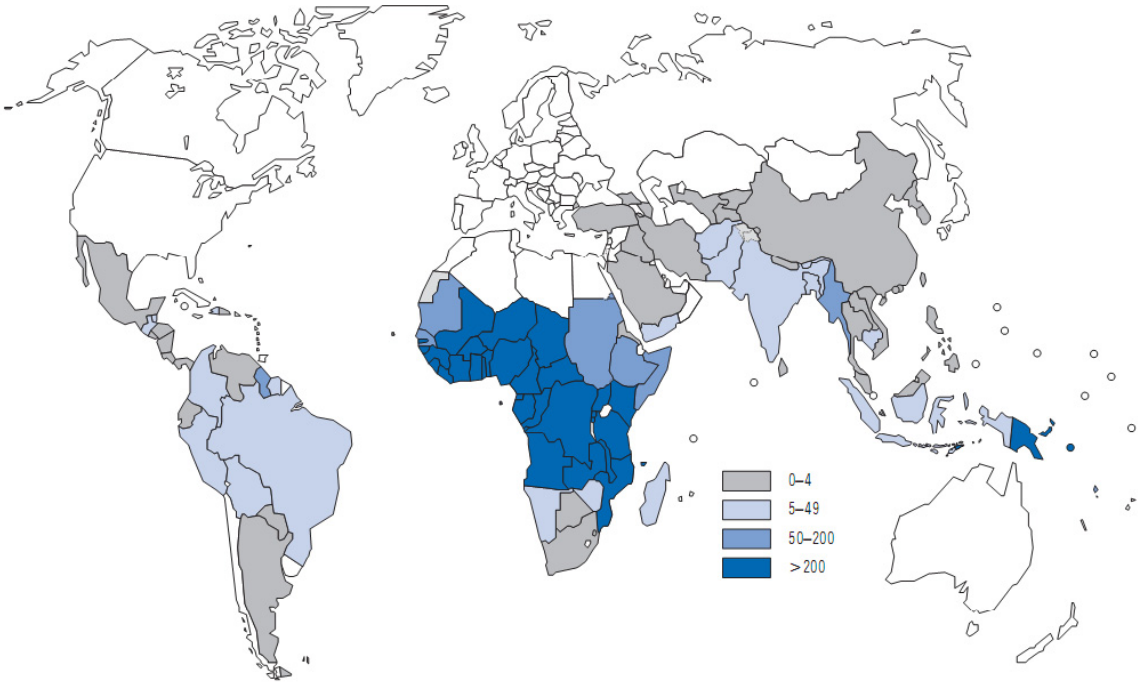


Figure 3. Incidence estimée du paludisme dans le monde en 2006, pour 1000 habitants (Source : World Malaria Report 2008).

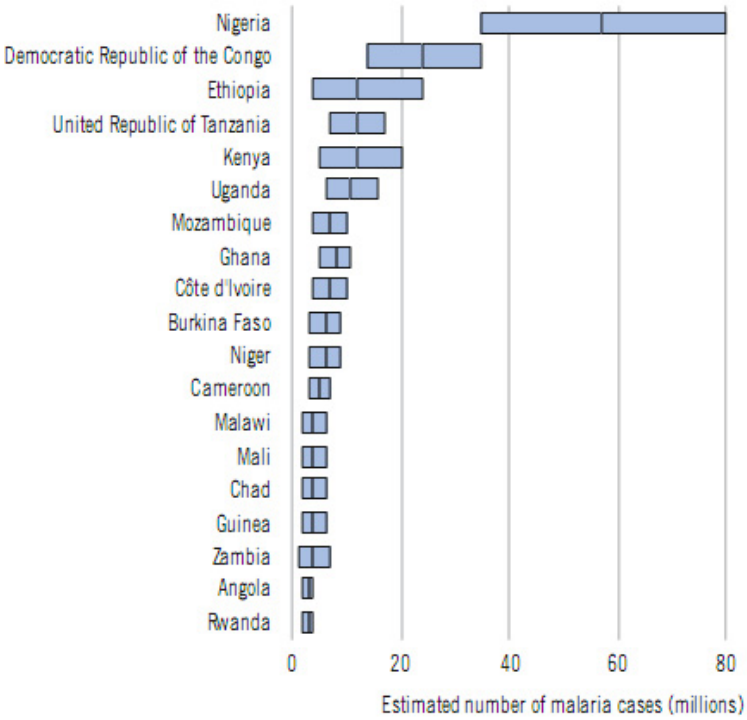


Figure 4. Nombre de cas de paludisme estimés en 2006 dans les 19 pays africains les plus touchés, totalisant 90% des cas de la région africaine. Les barres bleues indiquent les 5ème et 95ème centiles. Ces données présentent une incertitude plus ou moins importante, selon le pays et les méthodes d'estimation employées (Source : World Malaria Report, WHO 2008b).

II.2. La lutte contre le paludisme

II.2.1. Evolution de la lutte contre le paludisme

A/ Des débuts de la lutte antipaludique au programme global d'éradication

L'identification du parasite responsable du paludisme par LAVERAN, la découverte des oocystes chez l'anophèle par ROSS, puis la démonstration du rôle des anophèles dans son cycle de transmission par GRASSI, BIGNAMI et BASTIANELLI à la fin du XIXème siècle ont permis de poser les bases du contrôle rationnel de la transmission du paludisme (RODHAIN and PEREZ 1985). Dès lors la lutte contre le paludisme s'est organisée, et le contrôle des vecteurs par la gestion de l'eau et des gîtes larvaires, l'emploi de larvicides et de mesures de protection individuelle permit l'élimination de l'endémie dans des zones marginales de distribution (NAJERA 2001). Mais ce n'est qu'après la découverte des propriétés insecticides du Dichloro-Diéthyl-Trichloroéthane (DDT) par MULLER en 1939 que les premiers programmes de lutte anti-vectorielle d'envergure ont pu être entrepris (RODHAIN and PEREZ 1985). Le DDT a ainsi été utilisé avec succès pendant la seconde guerre mondiale dans la lutte contre divers arthropodes vecteurs de pathogènes, puis a permis l'élimination du paludisme sur le territoire des Etats-Unis d'Amérique en 1952 après cinq ans d'un programme basé sur l'aspersion de DDT et le traitement des cas par la chloroquine. Un programme global d'éradication du paludisme utilisant les mêmes outils a ensuite été lancé par l'OMS en 1955, cependant l'Afrique sub-Saharienne et Madagascar n'en ont pas bénéficié, en raison de l'intensité présumée de transmission ainsi que du manque d'infrastructures sanitaires nécessaires à l'application du programme. De ce fait, le programme visait plutôt l'élimination du paludisme dans une série de pays que son éradication totale. Les premiers résultats furent encourageants, mais vecteurs et parasites n'ont pas partout répondu comme prévu, les progrès de la campagne ont ralenti, et des épidémies ont éclaté durant la phase de consolidation dans des zones ayant initialement

bien répondu. L'OMS tira les conséquences de ces résultats et modifia ses recommandations en 1978, après plusieurs révisions, passant d'une politique d'éradication et d'élimination à celle de contrôle du paludisme (NAJERA 1989; NAJERA 2001).

Le vaste programme débuté deux décennies plus tôt aura néanmoins permis de limiter les populations à risque de paludisme, ainsi que de déterminer les conditions requises à la réussite d'un tel programme, notamment la stabilité et l'engagement politique, la mobilisation de ressources financières importantes, l'intégration dans un système de santé correctement établi, l'implication d'un personnel qualifié, et une intensité de transmission de base faible à modérée. Malgré l'exclusion de l'Afrique de ce programme, l'efficacité des pulvérisations intradomicilaires de DDT a dans le même temps motivé le lancement de projets pilotes de lutte antipaludique dans plusieurs pays africains. Les résultats obtenus furent mitigés même si des réductions de la transmission ont été observées en zone de savane, notamment dans le nord du Nigéria (BRUCE-CHWATT and ARCHIBALD 1959; NAJERA 1989). L'OMS a par la suite lancé une importante étude de terrain dans la même zone, le projet Garki (MOLINEAUX and GRAMICCIA 1980), afin de préciser l'épidémiologie de la transmission du paludisme en Afrique et d'évaluer l'efficacité de pulvérisations intra-domiciliaires de propoxur (carbamate), couplées ou non à un traitement médicamenteux de masse, dans un contexte de forte intensité de transmission. Cependant l'extension de ces programmes n'a pas été planifiée, principalement en raison de la nécessité d'un système de santé structuré.

B/ La lutte antipaludique au XXIème Siècle

Depuis plus de 50 ans et les essais d'élimination et d'éradication, le contexte dans lequel les actions antipaludiques sont menées a considérablement changé. De nouveaux outils de lutte plus efficaces sont en effet disponibles, offrant des opportunités de réduire significativement le poids du paludisme dans le monde. Ces changements ont stimulé gouvernements, organismes de santé publique et bailleurs de fonds à envisager des actions plus ambitieuses et intensifiées, tout en tirant les leçons des échecs passés afin de fixer des buts réalistes. Ainsi, avec le lancement de l'initiative *Roll Back Malaria* (RBM) en 1998 par

l'OMS, le fonds des Nations unies pour l'enfance (UNICEF), la Banque mondiale et le Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD), le contrôle du paludisme en Afrique s'est intensifié grâce à l'augmentation importante de la mobilisation des ressources financières et de l'assistance technique apportées par la communauté internationale. Le partenariat RBM implique de nombreux acteurs contribuant à sa mise en œuvre : pays endémiques, partenaires de développement, pays donateurs, secteur privé, organisations non gouvernementales (ONG), institutions de recherche et bailleurs de fonds. Son rôle est de coordonner l'ensemble des contributions des différents partenaires, de favoriser la mise en œuvre des interventions recommandées par l'OMS dans les pays endémiques, de stimuler le financement de programmes de contrôle et de recherche et d'évaluer l'efficacité des actions menées et des stratégies employées (RBM 2005). La prise de conscience globale de la gravité de la situation du paludisme a permis de faire de cette maladie une des trois priorités sanitaires mondiales pour la recherche et la lutte, au travers de la création en 2002 du Fonds mondial de lutte contre le SIDA, la tuberculose et le paludisme (FMSTP). Le Fonds mondial, partenariat public/privé réunissant gouvernements, organisations multilatérales, société civile, secteur privé et communautés, est ainsi devenu un des principaux bailleurs ayant permis l'importante hausse des fonds alloués à la lutte antipaludique. L'implication des différents acteurs de la lutte contre le paludisme, des bailleurs de fonds aux Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) et autres acteurs sur le terrain, permet d'accentuer la lutte et d'intervenir dans des zones de plus en plus étendues, dans une tentative sans précédent de réduire significativement et durablement la transmission de *Plasmodium* et ses conséquences sur les populations vivant en zone d'endémie.

II.2.2. Méthodes et outils de lutte contre le paludisme

A/ La lutte anti-vectorielle

On peut distinguer la lutte contre les vecteurs du paludisme, ou lutte anti-vectorielle, des actions visant la réduction de l'intensité de transmission des parasites, bien que la lutte anti-vectorielle ait bien sûr des effets sur la transmission palustre. Les méthodes de lutte anti-vectorielle peuvent être séparées en plusieurs catégories :

- Les méthodes chimiques. Elles utilisent les propriétés de nombreuses substances végétales ou synthétiques permettant d'affecter, de repousser ou de tuer les vecteurs. Il existe un grand nombre de produits et de modes d'utilisation, mais le but recherché est toujours l'action efficace, rapide et persistante sur les vecteurs visés, tout en présentant le moins d'effets possibles sur l'homme et les organismes non-cibles (RODHAIN and PEREZ 1985). Les principaux composés synthétiques utilisés appartiennent aux groupes des organochlorés (DDT, dieldrine), des organophosphorés (malathion, fenitrothion, téméphos, chlorpyrifos), des carbamates (propoxur) et des pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyalothrine, alpha-cyperméthrine, bifenthrine). Ces produits peuvent être appliqués directement dans l'environnement (naturel comme domestique) sous différentes formulations (suspension, poudre mouillable, emulsion, tablette, microcapsule, etc…). En revanche, seuls les pyréthrinoïdes sont autorisés en imprégnation de moustiquaires (WHO 2006; WHO 2007). Un autre type de substance, appelée synergiste, peut être utilisée en même temps qu'un insecticide dans le but d'augmenter son efficacité ou de potentialiser son action. C'est par exemple le cas du pyperonyl butoxide (PBO) qui, bien que n'ayant aucune propriété insecticide propre, permet d'augmenter l'efficacité des pyréthrinoïdes en inhibant les enzymes de détoxication des insectes (MOORES and BINGHAM 2005). On peut également citer l'existence de régulateurs de croissance, protéines analogues d'hormones de mue ou de métamorphose, permettant d'empêcher le développement larvaire normal des insectes visés (RODHAIN and PEREZ 1985), bien qu'encore peu utilisés dans la lutte contre les

vecteurs du paludisme. Des résultats intéressants ont pourtant démontré une bonne rémanence de molécules ecdyzoïdes, actives à faible concentration (DARRIET 1987), qui pourraient être utilisées dans des contextes particuliers en complément d'autres méthodes.

- Les méthodes biologiques utilisent des organismes vivants et des virus capables d'affecter les populations d'arthropodes visés. Ce type de lutte a été envisagé dés la fin du XIXème siècle, puis délaissé avec l'apparition des insecticides synthétiques dans les années 1940 (LEGNER 1995). Cependant, l'intérêt pour les méthodes de contrôle biologiques n'a par la suite cessé de croître, d'abord avec l'apparition de la résistance des arthropodes aux insecticides, puis la prise de conscience environnementale globale (LEGNER 1995). Un grand nombre d'organismes prédateurs ou pathogènes d'arthropodes sont connus, mais leur utilisation dans la lutte contre des vecteurs d'importance médicale est relativement réduite. Certaines espèces de poissons culiciphages présentent un intérêt potentiel dans la lutte contre les larves d'anophèles (LEGNER 1995; RODHAIN and PEREZ 1985). De manière générale, ce type de lutte ne doit être envisagée qu'après une étude précise des conditions et de la biodiversité locales. Concernant les agents pathogènes d'arthropodes, assez peu sont utilisés de manière opérationnelle, mais des recherches sont menées afin d'identifier d'autres possibilités de lutte à l'aide de champignons (FARENHORST *et al.* 2009; HANCOCK 2009; SCHOLTE *et al.* 2004), virus, bactéries ou protozoaires (LACEY and UNDEEN 1986; LEGNER 1995). Les pathogènes présentent certains avantages par rapport aux prédateurs, principalement liés à leur sélectivité, les possibilités de production de masse et de stockage facilitant leur utilisation (LACEY and UNDEEN 1986). Les principaux organismes utilisés dans la lutte biologique opérationnelle contre les stades larvaires de *Culicidae* sont les bactéries *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis*, dont la variété *B.t. israelensis* (*Bti*) (BECKER 1998). Des organismes pathogènes peuvent également permettre de lutter contre les populations de moustiques adultes. Les champignons *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* ont ainsi montré de bons résultats sur plusieurs espèces de *Culicidae*, dont le principal vecteur du paludisme en Afrique sub-Saharienne, *Anopheles gambiae* s.s.

(FARENHORST *et al.* 2009; SCHOLTE *et al.* 2006; SCHOLTE *et al.* 2005). Les adultes infectés présentent des taux de survie et de fécondité réduits, ainsi qu'une moindre propension à prendre un repas sanguin (SCHOLTE *et al.* 2006). Affectant des paramètres clés définissant l'intensité de transmission du paludisme, ce type d'outil présente un potentiel important comme stratégie alternative du lutte antipaludique (BLANFORD *et al.* 2005) ou comme complément dans la lutte contre des populations résistantes aux insecticides chimiques (FARENHORST *et al.* 2009).

- Les méthodes écologiques visent à aménager l'environnement de manière à le rendre défavorable au développement ou à la survie des vecteurs. Le principal moyen de lutte écologique contre les anophèles vecteurs consiste à supprimer les gîtes larvaires potentiels par drainage, comblement ou amélioration de l'évacuation des eaux de pluie (KEISER *et al.* 2005; RODHAIN and PEREZ 1985). Ce type d'opération peut être envisagé dans certains cas, par exemple en présence d'un gîte important et très productif dans un village, mais s'avère souvent difficile à réaliser en raison de la présence de nombreux gîtes naturels disséminés et temporaires (BOMBLIES *et al.* 2008; GILLIES and COETZEE 1987). Cependant, il semble que la réduction des gîtes larvaires potentiels dans un périmètre relativement limité autour des habitations puisse avoir un effet important sur la transmission palustre locale (GU and NOVAK 2009), du fait que la moindre disponibilité de sites de ponte entraine probablement une augmentation de la durée du cycle trophogonique, accompagnée d'une baisse du taux de survie des vecteurs (GU *et al.* 2006; KILLEEN *et al.* 2001). Les méthodes de culture irriguée peuvent également être définies de manière à limiter les possibilités de développement des vecteurs, principalement par l'aménagement, l'entretien et le nettoyage des canaux, et l'assèchement périodique des parcelles (KEISER *et al.* 2005; MUTERO *et al.* 2000).

- Les méthodes génétiques sont en développement et aucune n'est actuellement applicable à la lutte opérationnelle contre les vecteurs du paludisme. Les principales pistes

envisagées concernent l'utilisation de mâles stériles entrant en compétition avec les mâles sauvages fertiles et permettant de réduire la fécondité des femelles sauvages, ainsi que la manipulation génétique de vecteurs dans le but de créer des souches réfractaires à l'infection (BOËTE and KOELLA 2003) ou principalement zoophiles (LYIMO and FERGUSON 2009). Le succès de l'emploi de moustiques génétiquement modifiés n'est qu'hypothétique et de nombreuses recherches sont nécessaires afin d'évaluer sa faisabilité. Les principales étapes vers la mise au point d'une telle méthode de contrôle du paludisme sont (1) la modification génétique stable d'anophèles vecteurs, (2) afin qu'ils soient résistants à l'infection par Plasmodium, et (3) la compréhension de la propagation de cette résistance dans les populations naturelles (WHO 1991). Cette dernière étape est probablement la plus critique, faisant intervenir de nombreux paramètres épidémiologiques et évolutifs notamment (BOËTE and KOELLA 2003). Bien que n'impliquant pas forcément l'introduction de transgènes dans les populations, l'utilisation de mâles stérilisés par irradiation a permis de lutter efficacement contre différents insectes, dont la lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*) et des ravageurs de cultures. Des recherches ont été menées à partir des années 1950 afin d'envisager le contrôle de culicidés d'importance médicale par cette technique, mais elles n'ont jamais abouti à leur mise en œuvre opérationnelle (DAME *et al.* 2009). Elles pourraient cependant être applicables au contrôle de vecteurs de *Plasmodium* dans certaines situations, notamment des zones où la transmission est très localisée, tel que le long du Nil au Soudan (AGEEP *et al.* 2009), dans le cadre de stratégies intégrées.

B/ La lutte contre la transmission

Outre les actions visant directement les populations de moustiques vecteurs, il est également possible de réduire l'intensité de transmission des populations de parasites, en limitant d'une part la taille du réservoir humain de parasites et d'autre part la fréquence des contacts entre populations humaines et vecteurs.

Diagnostics et traitements précoces et efficaces de l'infection sont les principaux moyens de réduction du nombre de porteurs de parasites, donc susceptibles de permettre l'ingestion

de ces derniers par des anophèles femelles lors d'un repas sanguin (RBM 2008). Des recherches et essais cliniques sont menés dans le but d'élaborer un vaccin préventif ou bloquant le développement parasitaire normal chez l'hôte humain afin d'empêcher sa transmission, mais aucun candidat vaccin n'a pour le moment montré suffisamment d'efficacité pour qu'une stratégie vaccinale opérationnelle puisse être envisagée (GREENWOOD and TARGETT 2009; SAUL 2007; WHO 2008b).

Le principe de base permettant de diminuer le contact homme-vecteur consiste à utiliser une barrière physique empêchant ou limitant la possibilité de piqûre durant les périodes d'activité des vecteurs. L'emplacement et la conception des habitations peuvent donc influer sur la fréquence de piqûre, en fonction de la facilité avec laquelle les femelles à jeun peuvent atteindre leurs occupants. L'installation de fins grillages comblant les principales ouvertures (portes, fenêtres et toitures) a montré son efficacité comme outil de contrôle du paludisme dans différents contextes (ATIELI *et al.* 2009; KIRBY *et al.* 2009; LINDSAY *et al.* 2002; NJIE *et al.* 2009). Si ce type d'intervention pourrait être avantageusement inclus dans un programme de lutte intégrée, il est actuellement peu développé. C'est sans conteste la moustiquaire qui constitue l'outil le plus utilisé à ce jour pour la protection individuelle contre les piqûres d'insectes hématophages nocturnes, dont les vecteurs du paludisme. Une barrière chimique peut également être employée afin de limiter le contact homme-vecteur, principalement par l'application de produits répulsifs sur la peau ou les vêtements, et par l'imprégnation des moustiquaires par des insecticides, ajoutant ainsi une barrière supplémentaire à la protection physique conférée par la moustiquaire. Cependant, d'autres dispositifs peuvent être employés afin de limiter les contacts homme-vecteur, parfois adaptés à des situations particulières. On pourra ainsi citer les rideaux imprégnés d'insecticide, qui ont montré leur efficacité pour réduire les taux de piqûre dans les habitations au Burkina Faso (CUZIN-OUATTARA *et al.* 1999) ou a Madagascar (RABARISON *et al.* 1997), les hamacs imprégnés utilisés avec succès dans une zone de forêt au Vietnam (THANG *et al.* 2009), les tentes imprégnées d'insecticide, particulièrement adaptées au situations d'urgence des camps

accueillant des populations déplacées, notamment lors de conflits armés (GRAHAM *et al.* 2004).

Par ailleurs, la lutte contre les vecteurs et la transmission sont étroitement liées et interdépendantes. En effet, la diminution des densités de populations anophéliennes à l'aide de méthodes de lutte antivectorielle entraîne une baisse du taux de piqûre, donc la probabilité de recevoir des piqûres infectantes. En fonction du contexte de transmission local, l'effet d'une telle réduction peut se traduire par une baisse significative du niveau de transmission et du nombre d'accès palustres, mais nécessite généralement une baisse importante des densités de vecteurs (MOUCHET *et al.* 2004; SMITH *et al.* 2005; SMITH *et al.* 2001). Inversement, certaines méthodes utilisées avant tout pour lutter contre la transmission parasitaire du vecteur infectant à l'homme sont aussi considérées comme des outils de lutte antivectorielle. Ainsi des moustiquaires imprégnées utilisées par une grande partie d'une population réduisent considérablement l'accès à la ressource sanguine pour les femelles à jeun, dont le taux de survie et de reproductivité peuvent diminuer en raison de contacts répétés avec les insecticides et du temps et de l'énergie utilisés à chercher une source de sang accessible.

C/ Utilisation des moustiquaires non imprégnées

L'usage de moustiquaires, d'abord constituées de fibres végétales, a été développé par de nombreux peuples et depuis des temps anciens, afin de lutter contre les insectes piqueurs nocturnes, tandis que l'intérêt de leur utilisation dans la prévention de maladies semble avoir été entrevu au début du XIXème siècle (LINDSAY and GIBSON 1988). Relativement peu de travaux ont cherché à déterminer le degré de protection conféré par les moustiquaires non imprégnées. Des observations effectuées depuis le début du XXème siècle, notamment lors de manœuvres militaires, ont fait état d'un effet protecteur des moustiquaires contre les piqûres de moustiques et l'infection palustre (GUYATT and SNOW 2002; LINDSAY and GIBSON 1988). Il faudra attendre la publication dans les années 1980 de deux études rétrospectives menées en Gambie (BRADLEY *et al.* 1986; CAMPBELL *et al.* 1987)

ayant montré une baisse des taux d'infection et de splénomégalie chez les enfants utilisant une moustiquaire non imprégnée. Cependant, la conception de ces études a pu en biaiser les résultats, d'une part en raison d'un distribution non aléatoire des moustiquaires, d'autre part car l'inclusion d'enfants protégés et non protégés venant des mêmes villages a pu entraîner une surestimation de leur effet protecteur (LINDSAY and GIBSON 1988). Il a en effet été montré que les anophèles à la recherche d'un repas sanguin peuvent être détournés vers les personnes dormant sans moustiquaire (LINES *et al.* 1987), augmentant ainsi l'exposition de ces dernières aux piqûres, donc au risque d'infection. Une étude effectuée dans la même zone avec villages témoins et villages ayant reçu des moustiquaires (essai contrôlé et randomisé) (SNOW *et al.* 1988b) n'a d'ailleurs pas permis de mettre en évidence l'effet protecteur précédemment montré. En revanche, une autre étude, toujours en Gambie (CLARKE *et al.* 2001), a montré une réduction de la prévalence parasitaire et de l'anémie sévère à modérée, liée à l'usage de moustiquaires non imprégnées, tout en excluant le transfert de piqûres infectantes vers les personnes non protégées vivant dans le même village. De plus, plusieurs études ont mis en évidence la protection contre les piqûres de moustiques (CHARLWOOD 1986; LINDSAY *et al.* 1989a; PORT and BOREHAM 1982), ainsi qu'une baisse de l'intensité de transmission palustre (BURKOT *et al.* 1990; HII *et al.* 2001), liées à l'utilisation de moustiquaires non imprégnées. Il convient également de noter que le degré de protection conféré par une moustiquaire non imprégnée dépend grandement de son état d'usure physique ainsi que de sa bonne utilisation (GILLETT 1985; LINDSAY *et al.* 1989a).

D/ La moustiquaire imprégnée d'insecticide : modes d'action et utilisations

L'apparition des insecticides synthétiques durant la seconde guerre mondiale a engendré un intérêt croissant pour les moustiquaires imprégnées d'insecticide, notamment utilisées par les forces armées Américaines (HARPER *et al.* 1947). Cependant, le programme global d'éradication du paludisme lancé par l'OMS en 1955 misa sur les pulvérisations intra-domiciliaires, et il faudra attendre les années 1970 et le développement des pyréthrinoïdes

de synthèse, moins toxiques pour les vertébrés homéothermes et l'environnement (TAKKEN *et al.* 1978), pour que l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides soit à nouveau envisagée. Les pyréthrinoïdes sont actuellement les seuls insecticides autorisés pour l'imprégnation de moustiquaires (WHO 2006; WHO 2007; ZAIM *et al.* 2000), en raison de leur efficacité à faible dose, de l'effet excito-répulsif induit ainsi que de la faible toxicité pour l'homme.

Les insecticides pyréthrinoïdes présentent une grande affinité pour le complexe protéique formant le canal Sodium Voltage-dépendant, élément indispensable au bon fonctionnement du système nerveux des insectes (Figure 5) (SATTELLE and YAMAMOTO 1988). En présence de pyréthrinoïdes, la cinétique d'ouverture du canal Sodium est modifiée (LUND and NARAHASHI 1983), provoquant plusieurs effets sur les insectes, et permettant d'expliquer leur efficacité dans la lutte contre les vecteurs du paludisme (DARRIET *et al.* 1984; LINES *et al.* 1987; MILLER *et al.* 1991) :

- Effet Knock-Down (KD). Le contact direct avec la matière imprégnée entraine une perturbation des influx nerveux et conduit à une paralysie momentanée du moustique ;
- Effet létal. En fonction de la durée de contact, de la quantité de matière active présente sur la moustiquaire et de la sensibilité du moustique, une exposition peut conduire à la mort rapide de ce dernier ;
- Effet excito-répulsif. Un comportement de fuite est rapidement induit par le contact direct de l'individu avec le matériau imprégné ;
- Effet "déterrent" ou dissuasif. Contrairement aux effets précédemment cités, celui-ci n'implique aucun contact physique entre le moustique et la moustiquaire. La présence d'une moustiquaire imprégnée à l'intérieur d'une habitation ou d'une chambre peut entraîner un comportement d'évitement du moustique, dissuadé d'y pénétrer par la perception de l'insecticide à distance.

On distingue deux groupes de molécules de structures différentes, les pyréthrinoïdes de type I dont fait partie la perméthrine et ceux de type II dont fait partie la deltaméthrine (HEMINGWAY *et al.* 2004). En effet, si le mode d'action est similaire, les effets induits sur le fonctionnement neuronal varient (VAIS *et al.* 2001), et pourraient expliquer des différences d'efficacité, notamment en présence de mécanismes de résistance (AMIN and HEMINGWAY 1989).

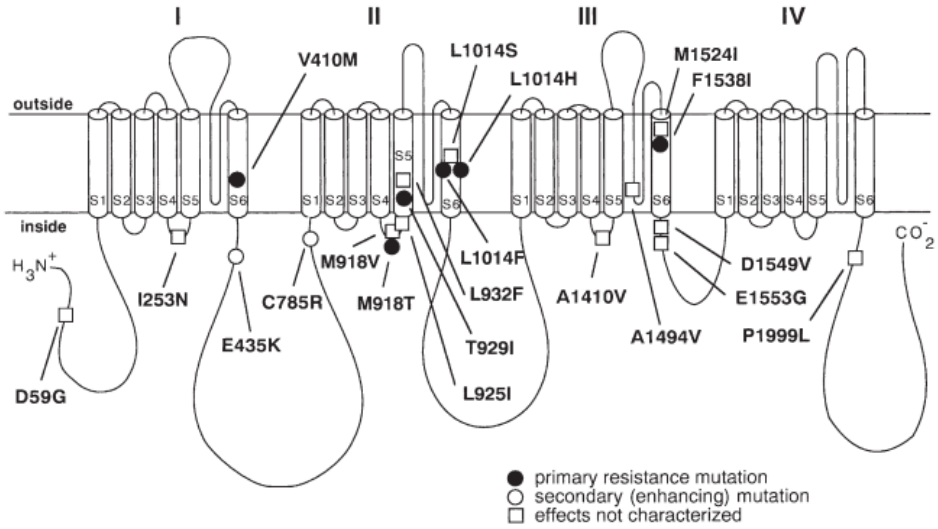


Figure 5. Représentation schématique de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant, cible des insecticides pyréthrinoïdes et du DDT. Les chiffres romains indiquent les quatre domaines homologues, chacun constitué de six segments transmembranaires en hélices. Les segments S5 et S6 délimitent le pore du canal et les segments S4 sont les parties sensibles au voltage. Les cercles pleins indiquent les principales mutations conférant la résistance aux insecticides. (Source : SODERLUND *et al.* 2003).

Des essais prometteurs ont montré l'efficacité de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes pour limiter les contacts homme-moustique (CURTIS and LINES 1985; DARRIET *et al.* 1984), et des études pilotes mirent en évidence leurs effets sur la morbidité et la mortalité liées au paludisme, en particulier chez les jeunes enfants (ALONSO *et al.* 1991; GRAVES *et al.* 1987; LENGELER and SNOW 1996). La moustiquaire imprégnée est donc devenue un des outils centraux de la stratégie recommandée par l'OMS dans le cadre de l'initiative *Roll Back Malaria* (RBM) contre l'endémie palustre en Afrique (RBM 2005).

L'utilisation communautaire de moustiquaires imprégnées influe sur plusieurs paramètres entomologiques clés déterminant la capacité vectorielle des populations anophéliennes (voir équation 1, page 11), donc l'intensité de transmission palustre : la densité anophélienne à l'intérieur des habitations (m), le nombre de repas sanguins pris sur l'homme (a) et le taux de survie (p).

Initialement, les techniques d'imprégnation des moustiquaires entraînaient une perte d'efficacité relativement rapide et nécessitaient un retraitement régulier à l'aide de solutions insecticides (MAXWELL *et al.* 2003). Mais des avancées récentes des méthodes d'imprégnation de moustiquaires ont permis l'essor d'une nouvelle génération de moustiquaires, les moustiquaires imprégnées d'insecticide longue-durée ou *Long-Lasting Insecticidal Nets* (LLINs ou LNs). La présence des insecticides au cœur de leurs fibres ou fixés à l'aide d'une résine permet la conservation de leur efficacité pendant plusieurs années et/ou après de nombreux lavages (GIMNIG *et al.* 2005; GRAHAM *et al.* 2005; KILIAN *et al.* 2008; LINDBLADE *et al.* 2005; SMITH *et al.* 2007; TAMI *et al.* 2004). Parmi les différentes LLINs disponibles sur le marché, les moustiquaires PermaNet® 2.0 (deltaméthrine 55 mg a.i./m^2) (Vestergaard Frandsen, Lausanne, Suisse) et Olyset® (perméthrine) (Sumitomo Chemical, Japon) ont obtenu la recommandation définitive de l'OMS et sont actuellement les plus utilisées, tandis que cinq autres sont recommandées de manière intérimaire et font l'objet d'études complémentaires (WHO 2009a).

E/ Limites de la lutte chimique et résistance aux insecticides

Les insecticides chimiques sont utilisés avec succès dans la lutte contre de nombreux vecteurs d'importance médicale, et occupent une place centrale dans les méthodes de contrôle du paludisme recommandées par l'OMS (RBM 2008). Cependant leur emploi présente certains inconvénients, dont le principal est le développement de mécanismes de résistance dans les populations de vecteurs, phénomène pouvant compromettre à terme l'efficacité des opérations de lutte. D'autre part, selon la stratégie utilisée, les risques potentiels pour la santé des populations ainsi que l'atteinte d'organismes non cibles doivent

être considérés. De manière générale, un insecticide doit être efficace à faible concentration et présenter une grande spécificité pour les insectes visés, réduisant les risques pour l'environnement à un minimum acceptable. Ces inconvénients sont à priori limités par l'utilisation d'insecticides de manière très ciblée, telle qu'en imprégnation de moustiquaires, du fait des faibles quantités nécessaires en comparaison aux aspersions intra-domiciliaires ou traitement des gîtes larvaires, par exemple. En revanche ce type d'utilisation impliquant une grande proximité des utilisateurs limite le choix de substances utilisables aux seuls pyréthrinoïdes (WHO 2006).

Des phénomènes de résistance ou de tolérance vis-à-vis d'un ou plusieurs insecticides ont été observés dans de nombreuses espèces d'arthropodes, vecteurs de pathogènes ou ravageurs de cultures (BROWN and PAL 1973). L'introduction de nouveaux composés insecticides a généralement été suivie d'une apparition rapide puis de l'expansion de mécanismes de résistance dans les populations naturelles (BROWN 1986). Dés 1947 des moustiques du genre *Aedes* résistants au DDT ont été observés en Amérique du Nord, peu après son introduction pour la lutte antivectorielle. L'expansion de la résistance au DDT dans les populations anophéliennes fut également identifiée comme une des causes probables des difficultés du programme d'éradication de l'OMS dans les années 1960. Les premières observations de populations anophéliennes résistantes au malathion (OP) ont été faites en Amérique du Sud en 1969 (GEORGHIOU *et al.* 1972) et en Inde en 1973 (RAJAGOPAL 1977), quelques années seulement après leur introduction. Concernant les vecteurs du paludisme de la zone Afrotropicale, des résistances d'*An. gambiae* s.l. à la dieldrine, au DDT ainsi qu'au HCH (Hexa-Chloro-Cyclohexane) ont été observées dés la fin des années 1950 dans de nombreux sites d'Afrique de l'Ouest et Centrale (BROWN and PAL 1973; HAMON and GARRETT-JONES 1963). Les insecticides chimiques de dernière génération, les pyréthrinoïdes, sont utilisés depuis les années 1970 pour la protection personnelle contre les insectes hématophages, et plus récemment en imprégnation de moustiquaires et aspersions intra-domiciliaires. Mais la grande majorité des quantités de pyréthrinoïdes utilisées dans le

monde le sont à des fins agricoles, utilisés pour lutter contre les insectes ravageurs de cultures. Il faudra cependant attendre 1993 pour la description des premières populations d'*An. gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoïdes en Côté d'Ivoire (ELISSA *et al.* 1993), retrouvées par la suite dans de nombreux pays (CHANDRE *et al.* 1999a). Le développement et le maintien de résistances dans des populations dépendent de la quantité et de la fréquence des traitements, ainsi que des espèces concernées. De manière générale, le cycle de vie court des moustiques est propice à l'expansion rapide de mécanismes de résistance. Si l'utilisation d'insecticides dans la lutte contre le paludisme de manière prolongée peut entrainer des problèmes de résistance, leur usage massif pour la protection de cultures, notamment de coton, de cacao et de café, constitue une source importante de pression de sélection exercée sur les populations culicidiennes (HAMON and GARRETT-JONES 1963; MOUCHET 1988).

Les tests de diagnostic développés par l'OMS (WHO 1998), relativement simple à mettre en œuvre, ont permis la description de nombreuses populations anophéliennes résistantes. Cependant, les mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans ces phénotypes de résistance ont été longtemps mal connus. Ces mécanismes peuvent être séparés en deux grands groupes : (1) les résistances d'origine métabolique, causées par des modifications d'expression et/ou d'activité d'enzymes de détoxication, et (2) les résistances liées à des mutations ponctuelles au niveau de gènes codant les protéines ciblées par les insecticides. Les résistances métaboliques impliquent trois groupes d'enzymes : glutathione S-transferases (GST), cytochrome P450 monooxygénases et carboxylesterases. Les GST possèdent de nombreuses fonctions, de par la présence de différentes classes au sein d'une famille multigénique, et peuvent être impliquées dans la résistance aux OP, organochlorés et pyréthrinoïdes. Les monooxygénases présentent une grande diversité génétique et de substrats, et peuvent conférer la résistance à toutes les classes d'insecticides connues. Les estérases sont fréquemment impliquées dans la résistance aux OP, carbamates et pyréthrinoïdes (HEMINGWAY *et al.* 2004). Les résistances liées au sites d'action peuvent être

dues à une ou plusieurs mutations au niveau des gènes codant l'acétylcholinestérase (AChE), le récepteur de type A de l'acide γ-aminobutyrique (GABA) ou le canal sodium voltage-dépendant (HEMINGWAY *et al.* 2004). Ces mutations ont pour conséquence de diminuer l'affinité des molécules insecticides pour leur cible spécifique. L'AChE, catalyseur de l'hydrolyse de l'acétylcholine, est le site d'action des OP et des carbamates. Le récepteur du GABA, présentant un canal ionique, est la cible de la dieldrine et du fipronil. Enfin, le canal sodium voltage-dépendant (figure 5) est la cible des pyréthrinoïdes et du DDT. Du fait du large spectre d'action des enzymes impliquées dans la détoxication et des cibles moléculaires partagées par différentes classes d'insecticides, il est fréquent d'observer des populations présentant une phénotype de résistance à plusieurs insecticides, y compris en présence d'un unique mécanisme de résistance. Ce phénomène de résistance croisée limite les possibilités de remplacement d'insecticides par les programmes de lutte.

Il convient ici de détailler la situation de la résistance d'*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* aux insecticides pyréthrinoïdes, espèces étudiées dans le cadre de ce travail et responsables d'une grande part de la transmission palustre en Afrique. Dans les années 1990, les observations de populations résistantes aux pyréthrinoïdes ont commencé à se multiplier (CHANDRE *et al.* 1999a; ELISSA *et al.* 1993; VULULE *et al.* 1994), et l'apparition de tests de diagnostic moléculaires et biochimiques ont permis de montrer que différents mécanismes de résistance pouvaient en être la cause. L'un des principaux mécanismes responsable de la résistance des populations *d'An. gambiae* s.s. aux pyréthrinoïdes ainsi qu'au DDT est la mutation *kdr* (*Knock-Down Resistance*), mutation ponctuelle ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) entraînant une substitution d'acide aminé au niveau d'une portion transmembranaire du canal sodium voltage-dépendant. Deux mutations *kdr* différentes au niveau du même codon 1014 ont en fait été décrites dans les populations d'*An. gambiae* s.s.: la mutation *kdr-w* (west) décrite en Afrique de l'Ouest (MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998), et la mutation *kdr-e* (east) décrite en Afrique de l'Est (RANSON *et al.* 2000a). Ces mutations ont été observées dans un certain nombre de populations d'*An. gambiae* s.s.,

avec une cooccurrence des deux mutations *kdr* en Afrique Centrale (Figure 6). La mutation *kdr-w* a d'abord été décrite dans des populations de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* (voir chapitre 1 partie III.2.) (CHANDRE *et al.* 1999c; DIABATE *et al.* 2002a), puis également chez *An. gambiae* M et *An. arabiensis* (DIABATE *et al.* 2003; VERHAEGHEN *et al.* 2006). Cependant, alors que de nombreuses populations ouest-africaines d'*An. gambiae* S présentent de fortes fréquences de *kdr-w* (AWOLOLA *et al.* 2005; CHANDRE *et al.* 1999b; DIABATE *et al.* 2002a; DIABATE *et al.* 2004; ETANG *et al.* 2006; FANELLO *et al.* 2003; KRISTAN *et al.* 2003; REIMER *et al.* 2008; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008; TRIPET *et al.* 2007; WEILL *et al.* 2000; YAWSON *et al.* 2004), seules quelques populations de forme moléculaire M en zone de savane humide ou côtière ont présenté la mutation, généralement a faible fréquence (DIABATE *et al.* 2003; DIABATE *et al.* 2004; ETANG *et al.* 2006; KRISTAN *et al.* 2003; REIMER *et al.* 2008; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008; YAWSON *et al.* 2004). La mutation *kdr-e* a en revanche été uniquement retrouvée dans des populations d'*An. gambiae* S, en Afrique de l'est et centrale, jusqu'en Guinée Equatoriale (RIDL *et al.* 2008) et au Cameroun (ETANG *et al.* 2006), mais pas au delà (PINTO *et al.* 2007; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008). Concernant *An. arabiensis*, quelques études ont fait état de populations présentant les mutations *kdr* à faible fréquence en Tanzanie (CHEN *et al.* 2008; KULKARNI *et al.* 2006), au Kenya (CHEN *et al.* 2008), en Ouganda (VERHAEGHEN *et al.* 2006), au Soudan (ABDALLA *et al.* 2008; HIMEIDAN *et al.* 2007), au Cameroun (NDJEMAI *et al.* 2009) et au Burkina Faso (DABIRE *et al.* 2009). Un tableau rassemblant les résultats d'une grande partie des articles publiés sur le sujet est adjoint en annexe (Annexe 1).

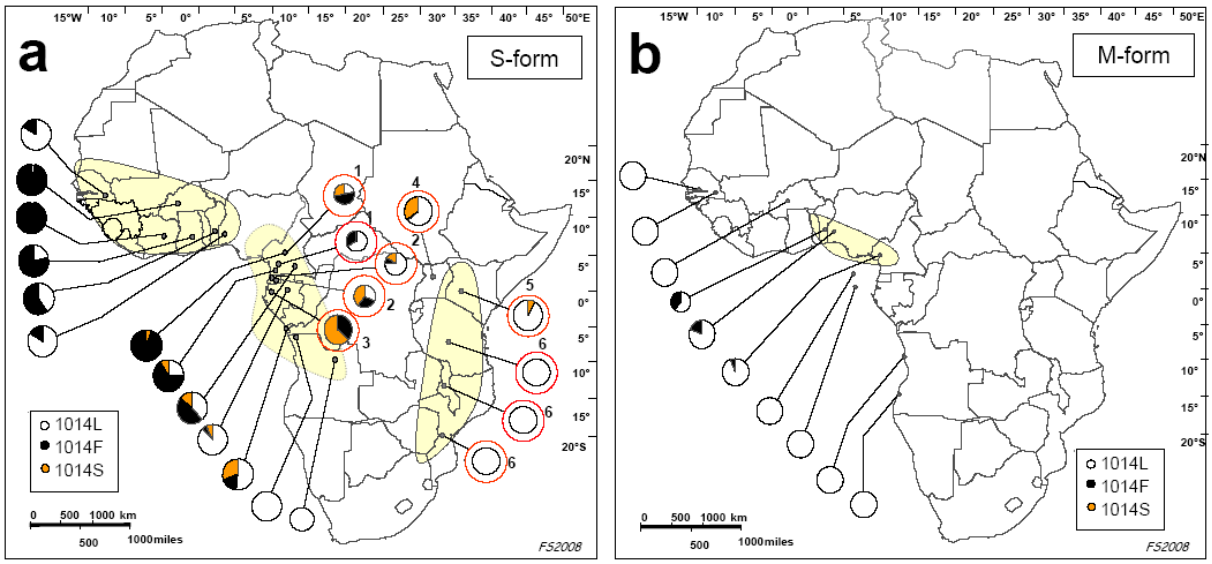


Figure 6. Distribution des mutations *kdr-e* (1014S) et *kdr-w* (1014F) dans les populations des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. Les zones colorées rassemblent des profils génotypiques relativement proches (Source : SANTOLAMAZZA *et al.* 2008).

L'association entre mutations *kdr* et phénotype de résistance aux pyréthrinoïdes a été mise en évidence dans plusieurs populations d'*An. gambiae* s.s. lors d'études expérimentales au laboratoire (CHANDRE *et al.* 2000; CORBEL *et al.* 2004; RANSON *et al.* 2000a; RANSON *et al.* 2004; REIMER *et al.* 2008), ainsi qu'au cours de tests sur le terrain à l'aide de cases expérimentales (CORBEL *et al.* 2004; DIABATE *et al.* 2006; KOLACZINSKI *et al.* 2000). Même si des mécanismes métaboliques ont également été impliqués dans la résistance de populations d'*An. gambiae* s.l. (CHEN *et al.* 2008; ETANG *et al.* 2003; MUNHENGA *et al.* 2008), il est considéré que la fréquence des mutations *kdr* est un bon indicateur du niveau de résistance des populations aux pyréthrinoïdes et au DDT (DONNELLY *et al.* 2009; KELLY-HOPE *et al.* 2008).

De plus, des changements comportementaux peuvent survenir après une utilisation prolongée d'insecticides, pouvant être assimilés à des mécanismes de résistance. Ainsi, dans le cas d'aspersions intra-domiciliaires d'insecticides (IRS), des vecteurs habituellement endophiles (*i.e.* se reposant à l'intérieur des habitations, principalement durant la digestion

du repas sanguin et la maturation des ovocytes) tels qu'*An. gambiae* s.s. et *An. funestus* peuvent être poussés à quitter les habitations dés le repas de sang prélevé, et ainsi éviter le contact avec l'insecticide (DARRIET 1991; SMITH and CHABEDA 1968). Ce type de comportement sera alors sélectionné, la fréquence des individus exophiles augmentant au fil des générations et entraînant une perte d'efficacité importante des aspersions intra-domiciliaires. D'autre part, il a été suggéré que l'utilisation régulière et étendue de moustiquaires imprégnées pourrait entrainer des modifications de la période d'activité des vecteurs, par la sélection d'individus qui présenteraient une tendance déterminée génétiquement à piquer plus tôt dans la soirée ou plus tard dans la matinée, ce qui diminuerait l'efficacité des moustiquaires (KNOLS and TAKKEN 1998). Plusieurs études de populations d'*An. gambiae* s.l. à ce sujet ont abouti à des résultats contradictoires. Ainsi des modifications de la période d'activité de piqûre ont été observées en Tanzanie (NJAU *et al.* 1993) et au Kenya (MBOGO *et al.* 1996a) tandis qu'elle est restée inchangée dans une autre étude menée au Kenya (MAGESA *et al.* 1991) ainsi qu'en Gambie (QUINONES *et al.* 1998). Cependant, ces études ont été menées peu de temps après l'installation des moustiquaires, et la sélection de facteurs génétiques responsables du comportement de piqûre n'a peut-être pas eu le temps d'être observée (PATES and CURTIS 2005).

F/ Gestion de la résistance et méthodes alternatives de lutte

Les pyréthrinoïdes étant actuellement les seuls composés autorisés pour l'imprégnation des moustiquaires, il est important que leur efficacité soit conservée le plus longtemps possible. L'approche classique consistant à évaluer la réussite d'un traitement insecticide, puis à en changer une fois qu'il n'est plus efficace n'est pas durablement envisageable. Différentes stratégies sont évaluées afin de limiter ou de retarder l'expansion des mécanismes de résistance. La recherche de méthodes alternatives de lutte nécessite de pouvoir suivre l'évolution spatio-temporelle des mécanismes de résistance dans les populations de vecteurs, ainsi que les facteurs impliqués, qu'ils soient d'origine biologique, génétique ou opérationnelle.

La principale stratégie considérée est l'emploi de plusieurs molécules en combinaison, présentant des effets et rapidité d'action différents, dans le but de potentialiser leur action et de permettre le contrôle efficace de populations résistantes. Mais les phénomènes de résistance croisée entre classes d'insecticides ainsi que les restrictions liées à l'usage de matériaux imprégnés a proximité des utilisateurs réduisent le choix de molécules alternatives et compliquent la mise au point de stratégies de gestion des résistances. Plusieurs combinaisons d'insecticides ont été testées, notamment en imprégnation de moustiquaires, sur des populations anophéliennes présentant un niveau de résistance important. Des moustiquaires traitées avec des OP ou des carbamates, seuls ou combinés à des pyréthrinoïdes, ont montré une bonne efficacité contre les anophèles résistants au pyréthrinoïdes (GUILLET *et al.* 2001; KOLACZINSKI *et al.* 2000). La combinaison du chlorpyrifos-methyl, un organophosphoré peu toxique pour l'homme, et de la lambdacyhalothrine a montré des résultats intéressant sur des populations présentant les mutations *kdr* et *Ace1*^{R} (ASIDI *et al.* 2005). De plus Il a également été montré que la mutation du gène codant l'AChE, principal mécanisme de résistance aux carbamates, n'était pas sélectionnée par la combinaison de la bifenthrine et du carbosulfane (carbamate), contrairement à ce dernier utilisé seul (CORBEL *et al.* 2003). Une étude récente (DJENONTIN *et al.* 2009) a également montré l'efficacité de l'utilisation conjointe de moustiquaires imprégnées de deltaméthrine et d'un revêtement mural en plastique imprégné de bendiocarb (carbamate) en présence de populations résistantes aux pyréthrinoïdes. L'utilisation du PBO en combinaison avec des pyréthrinoïdes apparaît également particulièrement intéressante dans le cadre de la lutte contre des vecteurs résistants aux insecticides en raison d'une surexpression d'enzymes de détoxication. L'inhibition transitoire d'estérases, notamment, causée par le PBO diminue leurs capacités à métaboliser les insecticides avec lesquels ils rentrent en contact (YOUNG *et al.* 2005). Une nouvelle moustiquaire imprégnée de deltaméthrine et de PBO (Permanet® 3.0, Vestergaard Frandsen, Lausanne, Suisse) a d'ailleurs montré des résultats prometteurs, et reçu une recommandation intérimaire de l'OMS (WHO 2009a). L'utilisation de moustiquaires imprégnées de faibles doses d'OPs en

combinaison avec un répulsif a également montré des résultats intéressants, y compris sur des populations résistantes (PENNETIER *et al.* 2008).

Au delà de la recherche de combinaisons de composés synthétiques efficaces sur les populations résistantes et permettant de limiter l'expansion des mécanismes impliqués, d'autres stratégies sont envisagées, notamment par l'association de plusieurs types de lutte, dans le cadre de stratégies intégrées adaptées aux contextes locaux. L'utilisation de champignons entomo-pathogènes pourrait par exemple compléter l'utilisation de moyens conventionnels tels que les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes, en tirant parti de leur mode d'action différent. Une efficacité conservée du champignon *Beauveria bassiana* a été observée sur des souches anophéliennes hautement résistantes à divers insecticides (FARENHORST *et al.* 2009), ayant de plus entraîné une baisse du niveau de résistance au DDT et à la perméthrine chez les individus infectés. Des travaux de modélisation (HANCOCK 2009) ont également souligné le potentiel d'associer moustiquaires imprégnées et champignons entomo-pathogènes dans la lutte contre le paludisme. Les infections fongiques des vecteurs influent sur différents paramètres d'importance épidémiologique, et leur évolution relativement lente n'entraîne pas de mortalité importante des individus jeunes, permettant en théorie de limiter la sélection de mécanismes de résistance à l'infection. Le même type d'approche, impliquant que seuls les moustiques d'un certain âge soient tués, pourrait être appliqué pour définir de nouvelles stratégies de lutte chimique (READ *et al.* 2009). En effet, si la forte pression de sélection exercée par les insecticides conventionnels est liée à leur action rapide sur tous les individus exposés, le fait que les femelles soient tuées après avoir effectué un certain nombre de pontes, mais avant de devenir infectantes, pourrait permettre de réduire l'intensité de transmission du paludisme tout en évitant de sélectionner les individus résistants à la molécule utilisée. La suppression des collections d'eau propices au développement larvaire pourrait également compléter l'utilisation des moustiquaires, de manière à limiter la disponibilité des gîtes de ponte donc à rallonger la durée nécessaire aux femelles gravides pour les localiser (YAKOB and YAN 2009). Des

stratégies dites "*push-pull*" pourraient aussi être envisagées dans la lutte contre les vecteurs du paludisme, mais n'ont été pour le moment évaluées que dans la lutte contre des ravageurs de cultures (COOK *et al.* 2007). Leur principe est d'éloigner les insectes visés des organismes à protéger (*push*), à l'aide de répulsifs ou de molécules signaux entraînant un comportement de fuite, puis de les diriger grâce à d'autres stimuli vers des zones où ils pourront être concentrés (*pull*), donc éliminés avec plus de facilité.

II.2.3. De l'outil au programme de lutte

A/ Stratégies de lutte

Avec les outils de contrôle actuels, la densité, le taux de survie des vecteurs et leur contact avec l'homme peuvent être modifiés par les interventions de lutte, ainsi que le nombre et la durée des infections dans le réservoir humain. Le traitement précoce et efficace des infections chez l'homme permet de réduire l'infectivité du réservoir, donc le taux de reproduction de base, tout comme les opérations de contrôle de vecteurs agissant sur leur capacité vectorielle. De manière générale, tout programme de lutte durable ne peut reposer sur une méthode unique de lutte antipaludique, et une meilleure efficacité est atteinte par l'utilisation conjointe de plusieurs outils. Dans le cadre d'une telle lutte, dite lutte intégrée, chaque méthode permet d'agir sur des paramètres épidémiologiques clés tout en complétant les autres méthodes employées, pour une meilleure efficacité globale. Les objectifs d'un programme de lutte antipaludique peuvent viser la réduction du poids de la maladie et son maintien à un niveau acceptable pour les populations (contrôle), l'élimination de la maladie d'une zone géographique donnée (incidence zéro des infections contractées localement), jusqu'à l'éradication (réduction permanente à zéro de l'incidence dans le monde entier).

L'objectif global visé depuis le lancement du programme RBM est le contrôle du paludisme, afin de réduire de moitié le poids de la maladie d'ici 2010, conformément aux engagements pris en 2000 par les chefs d'états africains à Abuja, Nigeria (WHO 2000), ainsi

qu'aux objectifs du millénaire pour le développement relatifs à la mortalité infantile, la santé maternelle, et la lutte contre le paludisme (UNDP 2007). Mais l'ONU et l'Union Africaine ont appelé à une vision à plus long terme, et un plan stratégique mondial pour la période 2005-2015 a été présenté (RBM 2005), suivi en 2008 d'un nouveau plan d'action mondial (RBM 2008). Les stratégies et objectifs opérationnels adoptés sont :

- La lutte contre la morbidité et la mortalité par un diagnostic précoce et une prise en charge adaptée des cas. Le déploiement de ces interventions doit permettre de prendre en charge 80% des personnes atteintes. Le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes est aussi utilisé en zone de forte transmission ;
- La lutte contre la transmission à l'aide de méthodes adaptées de lutte antivectorielle, dont l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides et de pulvérisations intradomiciliaires d'insecticide rémanent. La protection de 80% des personnes à risque d'infection est atteinte en 2010, et se poursuit durablement ;
- La lutte contre les épidémies par la mise en place de mesures prédictives ou permettant une détection précoce, ainsi que par des actions rapides visant à limiter leur importance et leur impact sur la santé des populations.

Les LLINs présentent de nombreux avantages, tant en terme d'efficacité de protection que pour la mise en œuvre des programmes de contrôle, et sont donc choisies pour la grande majorité des opérations organisées depuis plusieurs années, comme le préconise l'OMS (RBM 2005). Alors que le nombre de moustiquaires imprégnées classiques distribuées chaque année en Afrique a peu varié entre 2002 et 2006, le nombre de moustiquaires longue-durée a fortement augmenté à partir de 2004 pour atteindre 36 millions d'unités distribuées en 2006 (WHO 2008c), représentant 70% des moustiquaires distribuées par les PNLP. Il a ainsi été estimé que le pourcentage d'enfants africains de moins de cinq protégés par une moustiquaire imprégnée est passé de 1,8% en 2000 à 18,5% en 2007, progrès important mais laissant encore une grande majorité de populations non protégées (NOOR *et al.* 2009).

B/ Mise en œuvre et efficacité des programmes opérationnels

Les moustiquaires imprégnées classiques présentent l'inconvénient de devoir être ré-imprégnées régulièrement, au moins une fois par an (MAXWELL *et al.* 2003). Les programmes de lutte antipaludique basés sur l'utilisation de ces moustiquaires doivent donc prévoir leur ré-imprégnation périodique. Différentes stratégies ont été employées, mais les taux de ré-imprégnation n'ont généralement pas été très élevés et n'ont pas permis d'envisager la mise à l'échelle de ces interventions de lutte (WHO 2003). L'apparition des moustiquaires longue-durée a permis de s'affranchir de ce problème, et a stimulé l'élaboration de vastes programmes de lutte basés sur leur utilisation. Le meilleur moyen d'atteindre une couverture importante et équitable dans un délai assez bref est la distribution de masse gratuite (WHO 2005), dont la plupart ont été couplées à des campagnes de vaccination de masse, dans une stratégie intégrée efficace et réduisant les coûts par une économie d'échelle (GRABOWSKY *et al.* 2005). Cependant, des approches complémentaires de distribution de LLINs sont nécessaires afin d'améliorer la couverture atteinte par les distributions de masse et la maintenir dans la durée (LENGELER *et al.* 2007). Ainsi, la disponibilité continue des moustiquaires dans les maternités ou structures de marketing social permettent de protéger les femmes devenues enceintes et les enfants nés après les campagnes, ou de remplacer les moustiquaires détériorées. De plus, la protection de populations non ciblées par les distributions gratuites doit également être possible par le biais du secteur commercial.

En fonction du contexte épidémiologique local, le ciblage des populations les plus vulnérables face au paludisme peut-être envisagé comme stratégie de contrôle (WHO 2005). A défaut de pouvoir protéger l'ensemble des populations à risque, cette stratégie permet en effet de maximiser l'efficacité du programme par une allocation optimale des ressources matérielles, autrement dit par la protection des personnes en ayant le plus besoin. Cependant, une telle stratégie ne tient pas compte des bénéfices potentiels d'une plus grande couverture sur l'ensemble de la communauté. Plusieurs études (BINKA *et al.* 1998; GIMNIG *et al.* 2003a; GIMNIG *et al.* 2003b; HAWLEY *et al.* 2003; HOWARD *et al.* 2000; MAXWELL

et al. 2002) ont en effet mis en évidence la protection communautaire apportée par les ITNs, bénéficiant également aux personnes n'utilisant pas de moustiquaire. Cette réduction globale du risque d'infection est due à la mortalité accrue des populations de vecteurs, à la moindre disponibilité des sources de sang humain, ainsi qu'à la protection des personnes dormant à proximité d'une moustiquaire imprégnée liée à l'effet à distance dissuadant les femelles de pénétrer l'habitation (CARNEVALE *et al.* 1988; ROBERT and CARNEVALE 1991). De plus, il a été estimé (Ross et al. 2006) qu'une part importante des cas de transmission homme-moustique implique des adultes et des enfants de plus de cinq ans. Les ITNs permettent donc de réduire la transmission de *Plasmodium* de par leur impact direct sur la mortalité et le HBR des vecteurs, ainsi qu'en limitant la prévalence, la densité et la circulation des parasites dans les populations humaines. Programmes pilotes et modèles de transmission (HAWLEY *et al.* 2003; KILLEEN *et al.* 2007) s'accordent pour suggérer que l'utilisation d'ITNs par plus de la moitié de la population globale permettrait d'atteindre un effet au niveau communautaire en plus de la protection des seuls utilisateurs. C'est pourquoi l'objectif d'atteindre et de maintenir une couverture totale des populations à risque de paludisme est dorénavant visé, en utilisant des méthodes de lutte appropriées à la situation locale (RBM 2005).

Des études pilotes ont permis de démontrer l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans différents contextes de transmission, traduite par la baisse de l'intensité de transmission palustre ainsi que des morbidités et mortalités associées (JAENSON *et al.* 1994; PREMJI *et al.* 1995; SEXTON *et al.* 1990; SNOW *et al.* 1988a). Des études menées à l'échelle du village ont mis en évidence une baisse de l'abondance, des taux de survie et d'infection des populations *d'An. gambiae* s.l. (GIMNIG *et al.* 2003a; GIMNIG *et al.* 2003b; MAGESA *et al.* 1991; ROBERT and CARNEVALE 1991), tandis que d'autres n'ont pas noté de tels effets (LINDSAY *et al.* 1993; QUINONES *et al.* 1998). Ces différences d'impact pourraient être liées à la situation locale, pouvant permettre des déplacement plus ou moins fréquents des vecteurs entre villages traités et villages témoins, notamment du fait de la distance entre villages et de la localisation des gîtes larvaires par rapport à ceux-ci (QUINONES *et al.* 1998). Si les

programmes opérationnels intègrent généralement un suivi de l'implémentation des interventions, permettant par exemple d'estimer les taux de couverture et d'utilisation des moustiquaires, il est en revanche plus rare que ces programmes fassent l'objet d'études d'impact sur la transmission palustre et les manifestations cliniques associées. Ces évaluations sont pourtant très importantes pour mesurer les bénéfices réels d'interventions menées à grande échelle, dans des conditions moins contrôlées que lors de programmes pilotes (LENGELER and SNOW 1996). Relativement peu de données ont été publiées en relation avec les programmes nationaux de contrôle organisés depuis le lancement de l'initiative RBM dans nombre de pays africains. Un programme national de distribution de moustiquaires imprégnées de perméthrine mené en Gambie en 1992 avait permis d'éviter un décès sur quatre chez les enfants de moins de neuf ans, toutes causes confondues (D'ALESSANDRO *et al.* 1995). Cependant la Gambie est un pays de taille réduite (superficie de 11300 km²) peuplé en 2008 par moins de 2 millions d'habitants. Un autre programme basé sur le marketing social a également montré de bons résultats dans deux districts en Tanzanie, avec une couverture de plus de 50% ayant entraîné une augmentation de 27% du taux de survie entre un mois et quatre ans (SCHELLENBERG *et al.* 2001). Il faudra ensuite attendre les résultats d'un programme de distribution gratuite de moustiquaires imprégnées au Kenya, évalués au niveau de quatre districts (FEGAN *et al.* 2007). Le taux de couverture en moustiquaires imprégnées y a atteint 67% et a entrainé une réduction de 44% de la mortalité des enfants de moins de cinq ans, avec un effet maximum dans les zones de plus forte intensité de transmission palustre. Cette efficacité a semblé principalement résulter de la protection personnelle conférée aux utilisateurs de moustiquaires imprégnées, sans effet de masse apparent sur le risque d'infection pour l'ensemble de la population (FEGAN *et al.* 2007). Sur l'île de Bioko (Guinée Equatoriale), un programme d'aspersion intra-domiciliaire de carbamates dés 2004, de traitement des cas de paludisme par les ACTs dés 2005 et de distribution de moustiquaires imprégnées longue-durée en 2007, a permis une réduction importante de l'intensité de transmission ainsi que de la morbidité et de la mortalité chez les jeunes enfants (KLEINSCHMIDT *et al.* 2009). Le même type de combinaison d'interventions a

entraîné une chute importante des infections à *P. falciparum* et du taux de mortalité associé dans plusieurs pays à intensité de transmission modérée à forte, en Erythrée (GRAVES *et al.* 2008), au Rwanda (OTTEN *et al.* 2009; WHO 2009b) et en Tanzanie (BHATTARAI *et al.* 2007). Ces études intéressantes n'ont en revanche pas été accompagnées de suivis des populations de vecteurs, et peu de données ont à ce jour été publiées sur les effets de larges programmes de contrôle sur les paramètres entomologiques d'importance épidémiologique. Ce type d'étude est pourtant important, qu'elles documentent les effets positifs ou négatifs de telles interventions sur les populations de vecteurs. On peut tout de même citer une étude récente (SHARP *et al.* 2007a) menée dans le cadre d'interventions de contrôle à base d'aspersions intradomiciliaires de bendiocarb et de traitements aux ACT conjointement en Afrique de Sud, Mozambique et Swaziland, et restreinte à un territoire frontalier entre ces trois pays, où une baisse de prévalence et de risque d'infection à *P. falciparum* a été accompagnée d'une diminution des taux d'infection d'*An. arabiensis* et *An. funestus*.

L'effet non souhaité constituant la principale crainte de la communauté scientifique et des programmes de lutte est le développement de mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes, qui pourraient à terme compromettre l'efficacité des moustiquaires imprégnées actuellement disponibles. Des études expérimentales ont en effet montré que les individus homozygotes pour la mutation *kdr* sont bien moins sensibles aux effets irritant et paralysant des moustiquaires imprégnées, tandis que les hétérozygotes présentent un faible niveau de résistance (CHANDRE *et al.* 2000; CORBEL *et al.* 2004). Cependant les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes ont conservé une bonne efficacité en terme de protection personnelle en présence de populations anophéliennes résistantes (ASIDI *et al.* 2004; CHANDRE *et al.* 2000; DABIRE *et al.* 2006; DARRIET *et al.* 2000; GUILLET *et al.* 2001; HENRY *et al.* 2005; WHO 1999). Les individus porteurs de la mutation *kdr* restent généralement plus longuement en contact avec le matériau imprégné du fait d'une réduction de l'effet excito-répulsif, permettant d'expliquer le maintien de taux de mortalité élevés et de l'efficacité des moustiquaires (CHANDRE *et al.* 2000; DARRIET *et al.* 2000; HOUGARD *et al.*

2003). En contraste avec ces études, une baisse de l'efficacité de moustiquaires imprégnées de lambdacyhalothrine a été récemment montrée au sud du Bénin (N'GUESSAN *et al.* 2007), probablement liée à la présence dans les populations d'An. gambiae s.s. de mécanismes de résistance métaboliques, en plus de la mutation *kdr*. De plus, des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine (Permanet), dont la durée d'efficacité est théoriquement de plusieurs années, ont récemment montré une perte importante d'efficacité après quelques mois d'utilisation sur la souche Vk per d'*An. gambiae* s.s. présentant une fréquence élevée de la mutation *kdr-w* (TOURE *et al.* 2007). La surveillance des populations de vecteurs dans le cadre de programmes de distribution de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes est donc primordiale, d'une part afin d'identifier l'apparition d'éventuels phénomènes de résistance, et d'autre part dans le but d'évaluer l'impact de cette résistance sur l'efficacité des programmes. Peu de données sont actuellement disponibles à ce sujet, principalement du fait du manque de recul lié au démarrage relativement récent de ces interventions de lutte contre le paludisme. Une augmentation significative de la fréquence des mutations *kdr* a été observée dans des populations d'*An. gambiae* au Kenya après quatre ans d'utilisation d'ITNs (STUMP *et al.* 2004), ainsi que sur l'île de Bioko après des pulvérisations intra-domiciliaires (SHARP *et al.* 2007b). En revanche l'usage prolongé d'ITNs n'a pas entraîné de hausse des phénotypes de résistance en Afrique de l'Est (KULKARNI *et al.* 2007; VULULE *et al.* 1996).

III. Les vecteurs du paludisme

III.1. Les anophèles vecteurs de la zone Afrotropicale

III.1.1. Cycle de vie et bio-écologie

Toutes les espèces d'anophèles pondent leurs œufs un à un à la surface de l'eau. Ceux-ci sont peu résistants aux températures extrêmes et à la dessiccation. Après l'éclosion des œufs qui survient 24 à 48 heures après la ponte, on distingue quatre stades larvaires successifs de tailles croissantes, séparés par des mues. Après une dizaine de jours environ, la dernière mue transforme la larve du 4e stade en nymphe, qui ne se nourrit pas et subit d'importants bouleversements morphologiques, libérant l'anophèle adulte en un à deux jours environ. Après une phase d'inactivité nécessaire à la solidification de la cuticule, l'accouplement survient rapidement. Les femelles ne s'accouplant généralement qu'une fois dans leur vie, le stockage du sperme dans la spermathèque leur permet de l'utiliser tout au long de leur vie pour féconder les ovocytes. Des inséminations multiples ont toutefois été observées à faible fréquence chez *An. gambiae* s.s. (TRIPET *et al.* 2003). Les anophèles des deux sexes se nourrissent de sucs végétaux sucrés, cependant le repas de sang constitue pour la femelle un apport nutritionnel nécessaire à la maturation des ovocytes et conditionne la ponte suivante, qui survient environ 48 à 72 heures après celui-ci (RODHAIN and PEREZ 1985).

Les gîtes larvaires favorables aux différentes espèces d'anophèles sont très variés, pouvant aller des collections d'eau calme à des cours d'eau au débit important, permanentes ou temporaires, présentant ou non une végétation aquatique abondante, de taille variable, pouvant aller des bords de grandes mares à de petites collections telles que flaques, empreintes de sabots ou de pneus. Certaines espèces sont également plus adaptées à

l'exploitation de collections liées aux activités humaines. Ainsi les réseaux d'irrigation, notamment utilisés pour la culture du riz, peuvent par exemple constituer des gîtes favorables. De plus, certaines espèces sont plus adaptées à des conditions particulières (salinité, pH, concentration en sels minéraux, pollution organique, taille des gîtes, force du courant, faune et flore associées, etc …) tandis que d'autres tolèrent une grande variété de collections d'eau. Il est classiquement considéré que des eaux trop polluées ou chargées en matière organique ne permettent pas le développement des anophèles, comme en atteste leur abondance généralement limitée dans les centres urbains (MOUCHET *et al.* 2004). Cependant certaines espèces, dont *An. gambiae*, semblent s'adapter à des collections polluées, notamment par des métaux lourds, des hydrocarbures et des matières organiques dans certaines zones urbaines, pouvant faire craindre une hausse du paludisme urbain (AWOLOLA *et al.* 2007a; MIREJI *et al.* 2008; SATTLER *et al.* 2005). De manière générale, la distribution des populations anophéliennes est donc en grande partie déterminée par leurs préférences écologiques larvaires (MOUCHET *et al.* 2004).

III.1.2. Espèces impliquées dans la transmission de *Plasmodium*

Si l'hématophagie des femelles adultes est la règle au sein du genre *Anopheles*, il existe une grande diversité de comportements trophiques et de repos. Déterminés génétiquement, ces comportements conditionnent le rôle potentiel de chaque espèce dans la transmission d'espèces de *Plasmodium* ou d'autres pathogènes. Ainsi certaines espèces d'anophèles sont exclusivement zoophiles et ne sont par conséquent pas impliquées dans la transmission d'agents infectieux à l'homme, mais peuvent en revanche entretenir les cycles zoonotiques de divers pathogènes. Au delà de la rencontre physique entre le vecteur et le parasite par l'intermédiaire d'une personne infectée, de nombreux facteurs génétiques et immunitaires conditionnent les possibilités d'infection du moustique, puis de développement parasitaire jusqu'au stade potentiellement infectant pour l'homme. Ces facteurs intrinsèques définissent la compétence vectorielle de l'espèce considérée.

Un vecteur de *Plasmodium* humain de première importance présente les caractéristiques suivantes :

- Les femelles à la recherche d'un repas sanguin sont majoritairement attirées par l'homme ;
- Les femelles sont susceptibles à l'infection, et permettent un développement rapide, efficace, et complet des parasites rencontrés dans leur aire de distribution ;
- L'infection ne réduit pas ou peu leurs capacités de vol ou de piqûre ainsi que leur taux de survie ;
- Les populations sont adaptées à des biotopes proches de concentrations humaines et/ou partiellement anthropisés.

La forte intensité de transmission du paludisme mesurée en Afrique sub-Saharienne ainsi qu'à Madagascar est en grande partie due à quelques espèces vectrices majeures : *An. gambiae* sensu stricto (s.s.), *An. arabiensis* et *An. melas*, appartenant toutes trois au complexe *An. gambiae* sensu lato (s.l.) ; *An. funestus* s.s. appartenant au groupe *An. funestus*. D'autres espèces telles que *An. nili*, *An. pharoensis* et *An. moucheti*, qualifiées de vecteurs secondaires, jouent globalement un rôle moins important dans la transmission palustre, en raison de leur aire de distribution limitée ou de leur moindre capacité vectorielle, mais peuvent néanmoins participer localement au niveau de transmission de manière non négligeable. Certaines espèces d'anophèles peuvent de plus être impliquées dans la transmission d'autres pathogènes à l'homme, dont la filaire *Wuchereria bancrofti* responsable de la filariose lymphatique de Bancroft, ainsi que des arbovirus dont O'Nyong Nyong, alphavirus proche du virus Chikungunya (RODHAIN and PEREZ 1985).

III.2. Le complexe *Anopheles gambiae*

III.2.1. Composition, distribution et bio-écologie

D'abord considérée comme une espèce unique, *An. gambiae* Giles, 1902, fut identifié comme vecteur majeur de Plasmodies humaines en Afrique sub-Saharienne (ref). Dés les années 1940, la reconnaissance de la grande plasticité éco-phénotypique de ces moustiques, concernant notamment le type de gîte larvaire ou la propension à utiliser les habitations comme gîtes de repos, ainsi que de différences morphologiques fines de certains stades, suggéra l'existence du plusieurs "variants" à l'intérieur du taxon (BLACKLOCK and WILSON 1941; CHWATT 1945; MUIRHEAD THOMSON 1948). La démonstration de l'existence de cinq espèces distinctes au sein de ce qui devint le complexe *An. gambiae* a été apportée grâce à des croisements expérimentaux (DAVIDSON 1964a), et deux autres espèces ont été identifiées par la suite (DAVIDSON and HUNT 1973; HUNT *et al.* 1998). Les espèces faisant partie du complexe sont : *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. quadriannulatus* A, *An. quadriannulatus* B et *An. bwambae*. Des différences morphologiques ont été recherchées *a posteriori* sur des spécimens représentatifs des différentes espèces du complexe. Seules quelques unes ont été observées, notamment chez *An. melas* et *An. merus*, mais aucun critère morphologique n'a pu être identifié pour différencier de manière fiable les espèces du complexe (COLUZZI 1964; PETRARCA *et al.* 1998), ces espèces doivent donc être différenciées à l'aide de méthodes cytogénétiques ou moléculaires (COLUZZI *et al.* 2002).

An. gambiae s.s. et *An. arabiensis* sont les espèces du complexe les plus largement répandues en Afrique sub-Saharienne ainsi qu'a Madagascar (Figure 7) (COETZEE *et al.* 2000). *An. melas* et *An. merus* sont toutes deux des espèces ayant développé une tolérance pour le développement larvaire en milieu côtier, présentant nombre de collections d'eau salée ou saumâtre. *An. melas* est ainsi retrouvé le long du golf de Guinée, sur la côté ouest de l'Afrique, du nord du Sénégal à l'Angola, tandis que *An. merus* est uniquement présent

vers la côte est, du sud Somalien au nord-est de l'Afrique du Sud. Comme *An. merus*, *An. quadriannulatus* sp. est uniquement retrouvé en Afrique orientale, tandis qu'*An. bwambae* présente une distribution très réduite, vers la frontière ouest de l'Ouganda.

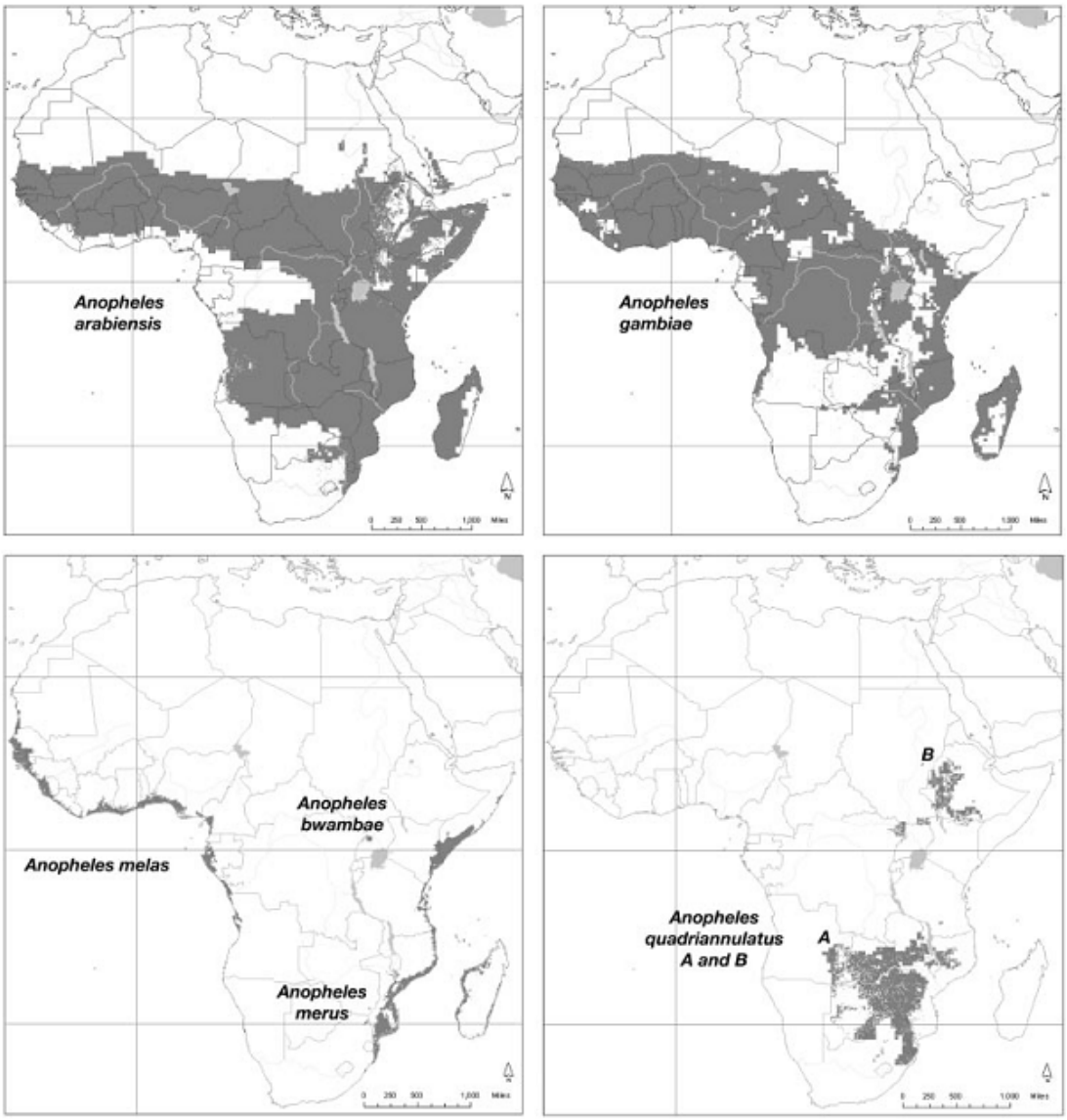


Figure 7. Distribution des espèces du complexe *An. gambiae* en Afrique (Source : AYALA and COLUZZI 2005).

Parmi les espèces du complexe, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont les vecteurs de *Plasmodium falciparum* les plus importants (WHITE 1974). En effet, ces vecteurs ont colonisé la majeure partie du continent, permettent un bon développement parasitaire, et sont

étroitement associés aux populations humaines. Par conséquent, nous nous bornerons à détailler les caractéristiques écologiques de ces deux espèces dans la suite de cette partie.

Les types de gîtes larvaires exploités par *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont généralement relativement temporaires (flaques, empreintes de sabots ou de pneus, puisards, etc ...), leur permettant d'exploiter toute opportunité de développement tout en limitant les risques de compétition et de prédation (GILLIES and COETZEE 1987). Les deux espèces sont adaptées à des gîtes larvaires semblables (WHITE and ROSEN 1973). En revanche les adultes d'*An. arabiensis* résistent mieux aux environnements secs et exploitent donc avec plus de succès les savanes et steppes arides (COLUZZI *et al.* 1979; PETRARCA *et al.* 2000). Cette plus grande tolérance à l'aridité entraîne également des variations saisonnières de leur proportion relative, *An. arabiensis* devenant généralement plus fréquent à mesure de l'avancée de la saison sèche, avant que la proportion d'*An. gambiae* s.s. n'augmente à nouveau en début de saison des pluies (WHITE 1973). Les collections d'eau d'origine anthropique, principalement liées à la riziculture irriguée, permettent également le développement de ces vecteurs (LINDSAY *et al.* 1991).

Les femelles *An. gambiae* s.s. sont considérées très anthropophiles, et présentent une forte propension à piquer (endophagie) et se reposer (endophilie) à l'intérieur des habitations, témoignant d'une association étroite à l'homme (COLUZZI *et al.* 1979; GILLIES and COETZEE 1987; WHITE 1974). Nombre d'études ont mis en évidence une tendance plus nette à la zoophilie chez *An. arabiensis* (GILLIES and COETZEE 1987; MOLINEAUX and GRAMICCIA 1980; WHITE and ROSEN 1973), espèce se nourrissant et se reposant également plus fréquemment à l'éxtérieur des habitations (exophagie et exophilie). Cependant, les préférences trophiques des deux espèces peuvent varier de manière importante, notamment en fonction de la zone étudiée et des conditions environnementales, dont l'abondance de bovins dans les communautés humaines. En contraste avec les études menées en Afrique de l'Ouest, *An. gambiae* comme *An. arabiensis* ont été trouvés principalement zoophiles au Sénégal (DIATTA *et al.* 1998) et à Madagascar (DUCHEMIN *et al.* 2001), et *An. arabiensis* en Ethiopie (HADIS *et al.* 1997) ainsi qu'en Tanzanie (MAHANDE *et al.* 2007). Il a été avancé qu'

An. arabiensis avait pu apparaître plus zoophile qu' *An. gambiae* du fait qu'il peuple des zones plus sèches où le bétail est plus abondant (DIATTA *et al.* 1998), et que la zoophilie des deux espèces est probablement sous-estimée lorsqu'elle est déterminée à partir de captures à l'interieur des habitations. Il est de plus admis que les préférences trophiques, déterminées génétiquement, peuvent évoluer en fonction des situations bio-écologiques rencontrées par les populations de vecteurs. Ainsi d'importantes variations du taux d'anthropophilie d'*An. arabiensis* ont été observées : populations principalement zoophiles dans des zones irriguées, où les nuisances culicidiennes sont fortes et stimulent une utilisation généralisée de moustiquaires, reduisant l'accès aux sources de sang humain ; et anthropophilie plus importante dans les zones environnantes (MURIU *et al.* 2008). De plus, des différences du taux d'anthropophilie au sein d'une même espèce, *An. gambiae* s.s., ont été récemment mises en évidence de manière expérimentale en conditions semi-naturelles par comparaison d'individus sauvages et issus de colonies d'élevage (LEFEVRE *et al.* 2009). *An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. présentent des périodes d'activité nocturnes, pour la recherche de repas sanguin comme de lieux de ponte, avec généralement un pic d'activité de piqûre en deuxième partie de nuit (LINDSAY *et al.* 1989a).

Ceci est bien sûr une figure générale et la situation est bien souvent plus complexe, notamment en raison de l'importante hétérogénéité génétique de ces populations, qui fait l'objet de la partie suivante, ainsi que de la diversité des situations bio-écologiques rencontrées.

III.2.2. Variabilité génétique et structure des populations

A/ Inversions chromosomiques et cytogénétique

L'importance d'*An. gambiae* en terme de santé publique et la possibilité d'observation microscopique de chromosomes polytènes (*i.e.* grand nombre de réplicats de chromosomes accolés et alignés, ou "chromosomes géants") chez les larves et femelles semi-gravides (COLUZZI 1968) a stimulé l'étude des chromosomes des espèces du complexe dés les

années 1960. Cette méthode, appelée cytogénétique, exploite la disposition de bandes claires et sombres le long des trois chromosomes, observables au microscope du fait de variations de réfringence selon les zones du génome en raison de leur niveau de condensation. Nombre d'inversions chromosomiques paracentriques ont ainsi pu être décrites au sein du complexe *An. gambiae* (COLUZZI *et al.* 1979). Certaines inversions sont fixées au sein d'une espèce, tandis qu'un grand nombre subsiste à l'état polymorphe dans les populations. De grandes variations du degré de polymorphisme existent selon l'espèce considérée. Ainsi *An. merus* ne présente aucune inversion polymorphe, *An. melas* et *An. quadriannulatus* en présentent quelques unes, tandis qu'un niveau élevé de polymorphisme est observé chez *An. gambiae* et *An. arabiensis* (COLUZZI *et al.* 1979), qui ont développé des combinaisons d'inversions stables, principalement localisées sur le chromosomes 2 (figure 8) (COLUZZI *et al.* 2002). Les inversions 2Rb, 2Rbc, 2Rd et 2La sont retrouvées chez *An. gambiae* comme chez *An. arabiensis*. La forte concentration d'inversions sur l'hémi-chromosome 2R, partageant parfois un même point d'inversion, permet de multiples combinaisons d'inversions.

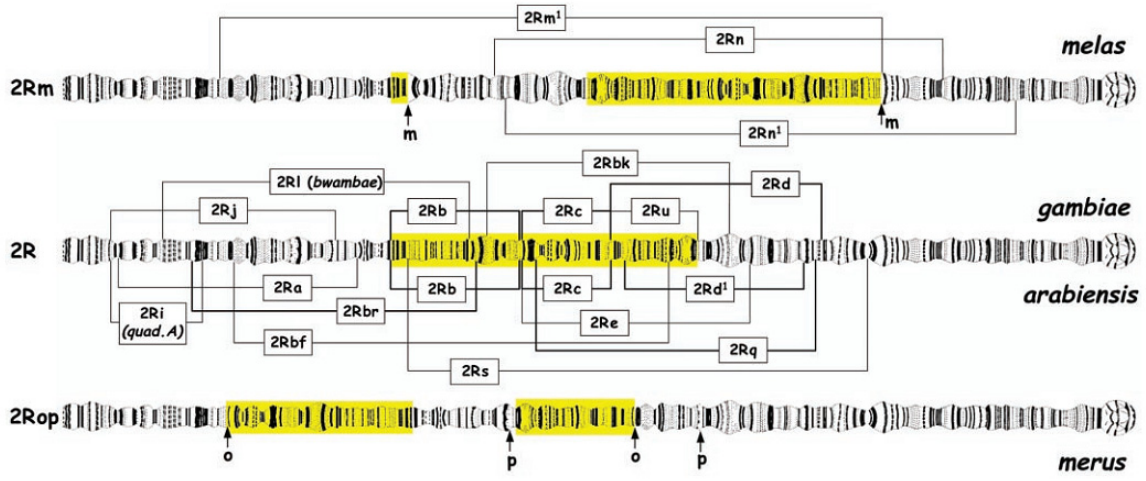


Figure 8. Représentation des principales inversions de l'hémi-chromosome 2R observées chez les espèces du complexe *An. gambiae*. Les flèches indiquent les limites d'inversions fixées (2Rm chez *An. melas*, 2Rop chez *An. merus*), tandis que les crochets indiquent les inversions polymorphes. La région couverte par la combinaison des inversions contigües 2Rbcu chez *An. gambiae* s.s. (représentée en jaune) est impliquée dans tous les

réarrangements du chromosome 2R différenciant les membres du complexe (Source : COLUZZI *et al.* 2002).

La cytogénétique a permis de distinguer *An. gambiae* et *An. arabiensis* sans avoir recours aux croisements expérimentaux, grâce aux caryotypage des spécimens (COLUZZI and SABATINI 1967; COLUZZI *et al.* 2002), et également d'étudier la survenue de croisements inter-espèces dans les populations naturelles. La plupart des croisements expérimentaux entre différentes espèces du complexe engendrent des mâles stériles et des femelles fertiles (DAVIDSON 1964a; DAVIDSON 1964b). L'introgression de matériel génétique entre espèces est donc possible par le biais de ces hybrides femelles. De rares hybrides *An. gambiae-An. arabiensis* ont ainsi été observés en Tanzanie (WHITE 1970a) et au Nigéria (COLUZZI *et al.* 1975), suggérant l'existence de barrières pré-zygotiques importantes.

Une répartition spatiale hétérogène de certaines inversions a été mise en évidence au sein de populations d'*An. gambiae* s.s. et d'*An. arabiensis*. A grande échelle, le niveau de polymorphisme présenté par les deux espèces est en effet supérieur en Afrique de l'ouest par rapport aux populations d'Afrique de l'est (COLUZZI *et al.* 1979; COOSEMANS *et al.* 1989; PETRARCA *et al.* 2000). Certaines variations observées à l'intérieur de la vaste zone de distribution d'*An. arabiensis*, par exemple pour l'inversion 2Ra, pourraient être dues au seul effet de la distance géographique et de barrières aux flux géniques. En revanche, la fréquence de la plupart des inversions polymorphes chez *An. gambiae* apparaît liée à la situation éco-climatique, tant à l'échelle des régions bio-climatiques qu'au niveau local, notamment en milieu anthropisé (COLUZZI *et al.* 1979). En effet, très peu d'inversions ont été observées dans les échantillons d'*An. gambiae* collectés en zone de forêt, tandis que leur nombre et leur fréquence augmentent dans les populations de savane (BRYAN *et al.* 1982; COLUZZI *et al.* 1979; MOSHA and PETRARCA 1983; TOURE *et al.* 1983). A l'échelle du village, certains caryotypes présentent notamment une plus grande propension au repos à l'intérieur des habitations (COLUZZI *et al.* 1979). Le polymorphisme des inversions chromosomiques

entraîne une grande flexibilité écologique, permettant aux vecteurs d'utiliser de manière optimale les conditions diverses rencontrées dans leur aire de distribution.

L'observation de combinaisons caractéristiques d'inversions au sein même d'*An. gambiae* s.s., semblant parfois entrainer des croisements non aléatoires au sein des populations, a conduit à la distinction de cinq "formes chromosomiques" nommées Mopti, Bamako, Savanna, Bissau et Forest (COLUZZI *et al.* 1985; TOURE *et al.* 1983). Ces formes présentent des préférences écologiques différentes, mais plusieurs formes sont fréquemment trouvées en sympatrie. La forme Mopti est ainsi bien adaptée aux savanes sahéliennes et zones irriguées, tandis que la forme Savanna est plus présente en zone soudanienne (SOGOBA *et al.* 2008; TOURE *et al.* 1998b). Depuis la description des formes chromosomiques, la question de leur statut taxonomique est activement débattue. Les différences écologiques ainsi que des déficits en hétérocaryotypes observés en zone de sympatrie au Mali et au Burkina Faso indiquèrent que peu de croisements survenaient entre formes chromosomiques et que ces dernières constituaient probablement des taxons en cours de spéciation au sein d'*An. gambiae* (COLUZZI *et al.* 1985; TOURE *et al.* 1998b). Cependant, la corrélation entre la distribution des inversions et des facteurs éco-climatiques suggéra également des pressions de sélection exercées par l'environnement, influant sur la fréquence des inversions (COLUZZI *et al.* 1979). Ces polymorphismes permettraient ainsi une adaptation aux conditions locales, au sein d'une espèce unique. De plus, des croisements expérimentaux ont montré que les différentes formes chromosomiques étaient entièrement inter-fertiles (TOURE *et al.* 1998b), venant conforter cette hypothèse.

Les études menées sur les inversions chromosomiques du complexe *An. gambiae* ont permis d'appréhender et de décrire la complexité génétique et écologique de ce système vectoriel. Ces avancées ont été capitales, tant pour la compréhension de l'épidémiologie de la transmission du paludisme que pour la mise en œuvre et l'évaluation des opérations de lutte antivectorielle. Cependant les techniques cytogénétiques employées sont relativement complexes à mettre en œuvre et présentent plusieurs limitations. Tout d'abord l'observation

des chromosomes polytènes n'est possible qu'à partir des glandes salivaires du quatrième stade larvaire ainsi que des cellules nourricières des ovaires de femelles semi-gravides (COLUZZI 1968). Ensuite, la réalisation, la lecture et l'interprétation des lames demandent une solide formation ainsi qu'un travail de microscopie long et minutieux. Enfin, la sélection exercée sur certaines inversions, supposée du fait de leur distribution spatio-temporelle, en fait des marqueurs mal adaptés pour l'étude des relations génétiques entre les espèces ou formes du complexe. L'essor des méthodes moléculaires permit ensuite de disposer de nouveaux outils pour l'étude du complexe *An. gambiae*, dont les apports sont présentés dans la partie suivante.

B/ Outils moléculaires d'étude du complexe gambiae

Des méthodes alternatives ont été développées pour l'identification et l'étude des espèces du complexe *An. gambiae*, d'abord biochimiques, utilisant l'électrophorèse d'iso-enzymes (MAHON *et al.* 1976) et l'analyse des hydrocarbones cuticulaires par chromatographie (CARLSON and SERVICE 1979; HAMILTON and SERVICE 1983; HUNT and COETZEE 1986), avant que les méthodes moléculaires d'analyse de l'ADN ne les supplantent, ces dernières présentant de nombreux avantages. L'ADN se conserve notamment bien plus facilement que les protéines, et permet le traitement de spécimens collectés à tout stade. Une fois rendues accessibles technologiquement par l'essor de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (SAIKI *et al.* 1988) et du séquençage de l'ADN dans les années 1980, ces méthodes ont ouvert de vastes possibilités de recherche de marqueurs polymorphes, applicables à l'identification des espèces comme à l'étude des liens phylogéniques entre espèces, de la structure génétique des populations au sein d'une espèce et des processus évolutifs responsables de cette variabilité génétique.

Plusieurs études ont rapidement mis en évidence des polymorphismes de L'ADN ribosomal (ADNr), porté par le chromosome X, permettant d'identifier les espèces du complexe (COLLINS *et al.* 1987; COLLINS *et al.* 1988; PASKEWITZ and COLLINS 1990). Un

grand nombre de copies de L'ADNr est présent dans le génome d'*An. gambiae* s.l. au niveau d'un locus unique (COLLINS *et al.* 1989). Ces unités, disposées en tandem, comprennent chacune les gènes codant les trois sous-unités ribosomales, deux séquences ITS (Internal Transcribed Spacers), une séquence ETS (External Transcribed Spacer) et une séquence IGS (Intergenic Spacer) (figure 9). Les séquences ITS et IGS sont non codantes et présentent des taux de mutation élevés. Celles-ci comportent généralement des mutations spécifiques à chaque espèce, tout en étant fixées au sein de populations panmictiques (COLLINS and PASKEWITZ 1996).

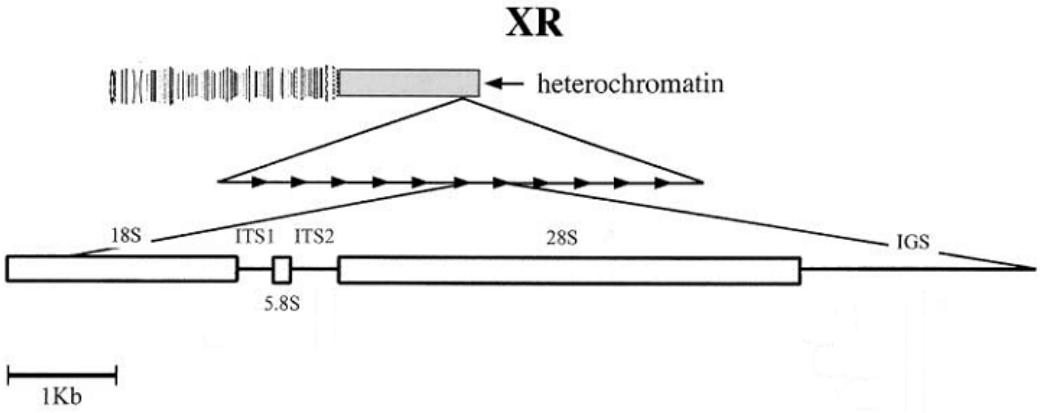


Figure 9. Schéma de la structure de l'ADN ribosomal chez *An. gambiae*. Situé dans une portion hétérochromatique proche du centromère du chromosome X, le locus est constitué d'un grand nombre de répétitions du motif de base. Ce dernier, d'une taille d'environ 9 kb, comprends les gènes codant les sous-unités 18S, 5,8S et 28S du ribosome (rectangles), séparés par des régions non codantes (ITS1, ITS2 et IGS) (Source : GENTILE *et al.* 2002).

Les variations nucléotidiques de la séquence IGS ont permis la mise au point d'une PCR multiplex de diagnostic des différentes espèces du complexe (SCOTT *et al.* 1993), simple à mettre en œuvre et largement utilisée. Ces nouveaux outils ont également permis d'étudier les formes chromosomiques *d'An. gambiae* s.s. et leur statut taxonomique, notamment par la recherche de variations génétiques fixées en dehors des inversions paracentriques. La distinction de la forme chromosomique Mopti des formes Savanna et Bamako a d'abord été rendue possible à l'aide de restrictions enzymatiques d'un fragment amplifié (PCR-RFLP) de la séquence IGS (FAVIA *et al.* 1997). Puis le séquençage d'une partie de cette séquence a révélé des substitutions nucléotidiques fixées, ayant permis la mise au point d'une PCR

diagnostic séparant la forme Mopti des formes Savanna et Bamako (FAVIA *et al.* 2001). Les séquences ITS des mêmes populations ont également montré des différences fixées chez la forme Mopti, par rapport à Savanna et Bamako (GENTILE *et al.* 2001; MUKABAYIRE *et al.* 2001). Une nouvelle nomenclature basée sur les polymorphismes de l'ADNr a introduit la notion de formes moléculaires, distinguant les formes M et S (DELLA TORRE *et al.* 2001). Les deux types d'ITS correspondent exactement aux formes moléculaires M et S, à l'exception de la population insulaire de Sao Tomé qui présente une séquence ITS unique (GENTILE *et al.* 2001). La forme moléculaire S correspond à la forme chromosomique Savanna dans les savanes sèches d'Afrique de l'Ouest, ainsi qu'à la forme Bamako présente au Mali, et à la forme Forest, caractérisée par très peu d'inversions, dans les zones plus humides situées autour du Golfe de Guinée. La forme moléculaire M correspond à la forme chromosomique Mopti au Mali et au Burkina Faso, mais cette correspondance n'est pas retrouvée dans d'autres régions (DELLA TORRE *et al.* 2001). En effet, la forme moléculaire M présente des caryotypes typiques de la forme chromosomique Forest dans les savanes humides, et des formes Savanna et Bissau au Sénégal, Côte d'Ivoire et Bénin. La confrontation des données issues des études cytogénétiques et moléculaires *d'An. gambiae* s.s. menées dans différents contextes écologiques a permis d'appréhender la complexité de ces populations. Il est ainsi apparu que les signes d'isolement reproductif et de subdivision observés dans les populations d'*An. gambiae* s.s. étaient corrélées aux variations de l'ADNr entre formes moléculaires, plutôt qu'aux inversions et formes chromosomiques. Par conséquent, la possibilité que les formes moléculaires M et S constituent deux espèces en voie de spéciation a dés lors été envisagée. En fait, les premières études des formes chromosomiques ont été menées au Mali et au Burkina Faso, où la correspondance avec les formes moléculaires est bonne (DELLA TORRE *et al.* 2005), ayant pu faire penser à une divergence évolutive causée par les inversions. A la lumière des analyses moléculaires de l'ADNr d'*An. gambiae* s.s., le rôle direct des inversions dans l'apparition de barrières aux flux génique au sein de l'espèce a pu être exclu (DELLA TORRE *et al.* 2001). L'isolement reproductif observé entre les formes moléculaires M et S dans les zones humides où elles

partagent le même caryotype, typique de la forme chromosomique Forest, en fût une des meilleures preuves. Le rôle des inversions dans l'adaptation écologique d'*An. gambiae* s.s. a par la même occasion été ré-affirmé (DELLA TORRE *et al.* 2001; GENTILE *et al.* 2001).

Les inversions chromosomiques, tout comme d'autres types de réarrangements chromosomiques, ont été impliquées dans certains processus de spéciation, notamment dans le cas de populations parapatriques ou partiellement sympatriques (AYALA and COLUZZI 2005). Au sein d'un environnement hétérogène, des populations soumises à des pressions de sélection divergentes peuvent en effet accumuler des variations génétiques, pouvant conduire à un isolement reproductif entre celles-ci, dans un processus de "spéciation écologique" (SCHLUTER 2001). Un tel processus suppose l'accumulation d'allèles sélectionnés positivement au sein d'une population périphérique ou isolée, puis le maintien de la liaison entre ces nouveaux allèles par la suppression des évènements de recombinaison chromosomique en cas de croisements avec la population principale, permettant ainsi la poursuite de la divergence écologique et génétique du nouvel "écotype", et l'apparition progressive de l'isolement reproductif aboutissant éventuellement à une nouvelle espèce. Les inversions paracentriques ont pu jouer ce rôle de suppresseur de recombinaison dans le cadre des processus de spéciation au sein du complexe *An. gambiae* (COLUZZI *et al.* 1985). Celles-ci entraînent en effet la suppression des évènements de recombinaison méïotiques dans la région chromosomique concernée dans le cas de gamètes hétérocaryotypiques, protégeant l'association de groupes de gènes portés par la portion inversée.

Au delà de l'intérêt fondamental de la compréhension des mécanismes génétiques et des forces sélectives impliqués dans la divergence des formes moléculaires d'*An. gambiae*, les variations biologiques ou écologiques entre formes M et S pourraient avoir des implications épidémiologiques, déterminant leur importance dans la transmission palustre. La différence la mieux documentée concerne leur aire de répartition. En effet, alors que la forme S est retrouvée dans la majeure partie de l'immense zone de présence d'*An. gambiae* s.s.,

depuis le Sénégal jusqu'à la côte est-africaine et Madagascar, la forme M est présente dans une zone plus réduite en Afrique de l'Ouest et Centrale, dont une grande partie en sympatrie avec la forme S (Figure 10) (DELLA TORRE *et al.* 2005; LEHMANN and DIABATE 2008). Les incursions de la forme M dans les zones sahéliennes et pré-désertiques soulignent une plus grande tolérance à l'aridité, également indiquée par sa présence majoritaire dans les zones ou périodes les moins humides de l'aire de présence des deux formes en sympatrie. En revanche, si la distribution de la forme S est limitée par le gradient d'aridité latitudinal à l'échelle du continent, la limite de distribution de la forme M au niveau de l'Afrique Centrale ne correspond pas à une hétérogénéité environnementale claire, tout en semblant stable dans le temps. Les causes de l'absence de la forme M en Afrique de l'Est sont inconnues et il serait intéressant de procéder à l'étude de populations proches de la limite de distribution estimée, qui permettraient de plus de préciser cette limite géographique dans les zones équatoriales d'Afrique Centrale. D'autres divergences ont été observées entres formes moléculaires. Les études de la mutation *kdr* conférant la résistance aux insecticides pyréthrinoïdes ont permis, outre l'identification des mécanismes de résistances et l'étude de l'introgression génétique entre formes, de montrer que certains phénotypes pouvaient différer entre formes M et S. En effet, les populations de forme S présentent généralement la mutation à une fréquence bien plus élevée que chez M, entraînant une baisse marquée de la sensibilité aux insecticides utilisés en imprégnation de moustiquaires (SANTOLAMAZZA *et al.* 2008). Il a également été suggéré que les préférences d'habitat larvaire entre formes moléculaires sont différentes (DIABATE *et al.* 2005), avec une tendance de M à préférer les gîtes permanents éventuellement d'origine anthropique tels que rizières et S plutôt retrouvé dans des gîtes naturels temporaires mis en eau lors d'épisodes pluvieux. De telles observations avaient auparavant été faites avec les formes chromosomiques (TOURE *et al.* 1998b) en Afrique de l'Ouest, où formes chromosomiques et moléculaires correspondent. D'autres divergences phénotypiques ont été récemment mises en évidence entre formes moléculaires, impliquant notamment la vitesse de développement, la compétition interspécifique et l'évitement des prédateurs chez les stades larvaires (DIABATE *et al.* 2008;

DIABATE *et al.* 2005), qui pourraient expliquer la ségrégation des formes M et S dans des collections d'eaux différentes, notamment en terme de dynamique temporelle de mise en eau. Peu de données sont publiées sur les possibles différences de capacité vectorielle des formes moléculaires d'*An. gambiae*. Pourtant, celle-ci peut être fortement modulée par certains traits d'histoire de vie, tels que la durée de vie, la stratégie reproductive ou la taille des adultes (LEHMANN and DIABATE 2008), qui pourraient varier entre formes M et S du fait de leur adaptation à des niches écologiques distinctes. Une récente étude menée à Dielmo, Sénégal (NDIATH *et al.* 2008), n'a par exemple pas montré de différence des taux d'infection et d'anthropophilie entre formes, mais des pics d'abondance décalés dans le temps, responsables d'un alongement de la saison de transmission palustre. Ce niveau de complexité supplémentaire au sein des populations d'*An. gambiae* s.s. confère à l'espèce une plus grande capacité d'adaptation aux situations bio-écologiques rencontrées, tout en permettant la passage de caractères adaptatifs entre formes moléculaires.

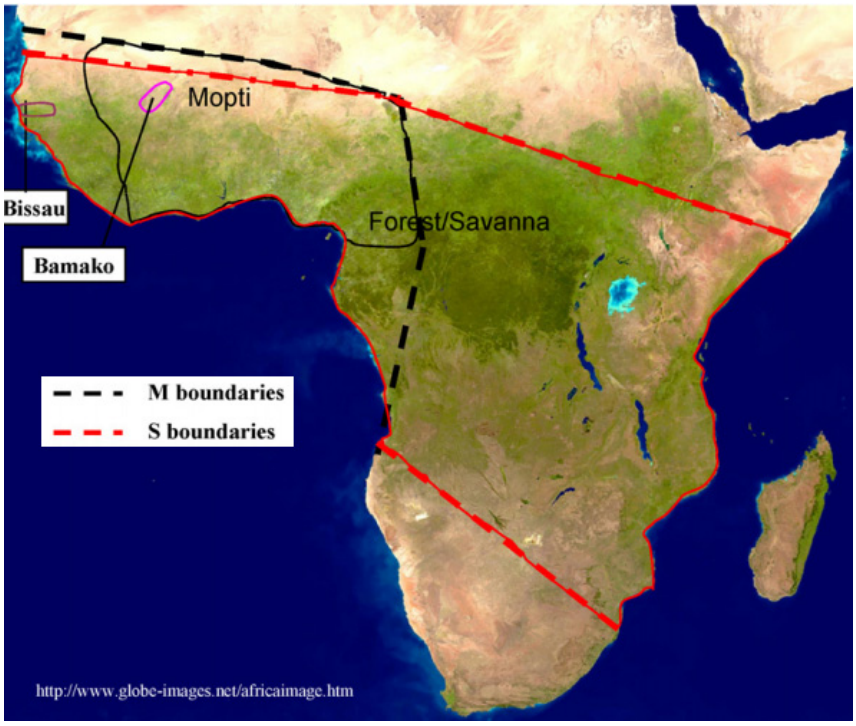


Figure 10. Représentation schématique des aires de distribution des formes moléculaires et chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. en Afrique Sub-saharienne. Le fond de carte issu de données satellitaires indique les zones de végétation en vert (Source : LEHMANN and DIABATE 2008).

Une autre avancée majeure fut le séquençage du génome complet d'*An. gambiae* s.s. (HOLT *et al.* 2002) mené sur la souche PEST, dont le but ultime est de mettre au point des nouvelles méthodes de lutte contre le paludisme, nécessitant la compréhension préalable de mécanismes génétiques d'intérêt tels que ceux responsables de la résistance aux insecticides, de l'anthropophilie ou de la susceptibilité à l'infection plasmodiale. Concernant la mise en œuvre des méthodes moléculaires d'étude du complexe *An. gambiae*, la possibilité d'extraire l'ADN de moustiques déshydratés est un avantage certain par rapport aux techniques biochimiques, beaucoup plus contraignantes quant à la conservation des échantillons biologiques. Ces méthodes sont donc très adaptées à l'étude des populations naturelles, impliquant la collecte de spécimens sur le terrain et leur transport jusqu'au laboratoire pour analyse. De plus, nombre de méthodes de diagnostic par PCR ont été publiées et sont accessibles à la majorité des laboratoires, moyennant des équipements relativement accessibles et peu onéreux. D'autres marqueurs moléculaires permettent d'étudier le polymorphisme génétique *d'An. gambiae* s.l., dont le choix dépend de la question étudiée. L'ADN mitochondrial (ADNm), hérité du génome maternel, peut présenter un intérêt pour l'étude de taxons relativement éloignés du fait de son évolution plus lente (BESANSKY *et al.* 1997). L'étude d'éléments transposables (transposons) au sein des populations d'*An. gambiae* a permis d'évaluer la différenciation génétique entre formes moléculaires (BOULESTEIX *et al.* 2007; ESNAULT *et al.* 2008). La mutation *kdr*, impliquée dans la résistance aux insecticides, a également fourni un marqueur intéressant dans l'étude des formes M et S, ayant permis de renforcer l'hypothèse de barrières importantes aux flux géniques inter-formes (DELLA TORRE *et al.* 2001; FANELLO *et al.* 2003). De plus, le séquençage des limites des inversions 2La et 2Rj a fourni des éléments nouveaux pour l'étude de l'évolution de complexe *An. gambiae*, et permis la mise au point de méthodes de diagnostic moléculaire de la présence de ces inversions (COULIBALY *et al.* 2007a; COULIBALY *et al.* 2007b; SHARAKHOV *et al.* 2006; WHITE *et al.* 2007). Enfin, l'étude de marqueurs microsatellites, nombreux et

distribués sur l'ensemble du génome, peut être appliquée à diverses problématiques, qui sont détaillées dans la partie suivante.

C/ Marqueurs génétiques et structure des populations

L'accès au génome rendu possible par l'essor des méthodes de biologie moléculaire a stimulé de nombreuses recherches concernant la phylogénie, la structure génétique et la dynamique des populations de vecteurs, ainsi que les gènes impliqués dans leur susceptibilité/résistance à l'infection par *Plasmodium* et l'action des insecticides. Une avancée majeure fut la publication en 1996 d'une carte génétique intégrée de l'ensemble du génome d'*An. gambiae* s.s. (ZHENG *et al.* 1996a), ayant décrit 131 marqueurs microsatellites répartis sur les trois chromosomes. Les séquences microsatellites sont composées de répétitions en tandem de motifs nucléotidiques simples (de une à six paires de bases), sont fréquentes dans la plupart des génomes, et sont co-dominantes (BARKER 2002). Le taux de mutation des marqueurs dinucléotidiques estimé chez *Drosophila melanogaster* (9,3 x 10^{-6} mutations/locus/ génération) est relativement élevé par rapport à d'autre régions génomiques (SCHUG *et al.* 1998), même s'il est plus faible que chez les mammifères (entre 10^{-2} et 10^{-5} mutations/locus/ génération) (DALLAS 1992; WEBER and WONG 1993), entraînant une importante variabilité du nombre de répétitions des motifs nucléotidiques de base entre individus. Localisées dans des régions non codantes et parfois dans des introns, ces séquences sont généralement considérées comme sélectivement neutres, hormis lorsqu'elles sont liées génétiquement à un locus proche sélectionné. Ces caractéristiques en font des marqueurs adaptés à l'étude de la structure des populations de vecteurs.

Les marqueurs microsatellites décrits chez *An. gambiae* (ZHENG *et al.* 1996a) ont largement contribué à faire progresser la compréhension de la phylogénie du complexe. Les inversions chromosomiques avaient déjà permis de poser des hypothèses quant aux relations phylogénétiques au sein d'*An. gambiae* s.l. (COLUZZI *et al.* 1979), mais celles-ci supposent une origine unique pour chaque inversion, qui a été réfutée pour l'inversion 2La (CACCONE *et al.* 1998). Des croisements expérimentaux ont également montré la possibilité

d'introgression de matériel génétique entre *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*, par l'observation du passage et du maintien d'inversions du chromosome 2 entre espèces (DELLA TORRE *et al.* 1997). L'analyse de loci microsatellites dans des échantillons des deux formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. ont montré une grande similitude génétique, en dehors de quelques marqueurs localisés à proximité du centromère du chromosomes X (STUMP *et al.* 2005a; STUMP *et al.* 2005b; WANG *et al.* 2001). Des travaux de séquençage ont confirmé la différenciation des formes M et S au niveau du centromère du chromosome X, et identifiée une autre zone différenciée proche du centromère du chromosome 2L (TURNER and HAHN 2007; TURNER *et al.* 2005). Ces résultats suggérèrent que les formes moléculaires sont probablement en voie de spéciation, avec des flux géniques inter-formes homogénéisant la majorité du génome, à l'exception des gènes impliqués dans les mécanismes d'isolement reproductif naissant. L'étude de toutes les espèces du complexe avec une résolution fine a récemment permis de confirmer les variations des profils de différenciation entre espèces selon les portions génomiques considérées (WANG-SATTLER *et al.* 2007), liées aux phénomènes d'introgression de matériel génétique, venant appuyer la théorie de "génome mosaïque" au sein du complexe. Ces études récentes ont de plus confirmé qu'*An. melas* et *An. merus*, malgré d'importantes similitudes écologiques et morphologiques, sont issues de processus de spéciation indépendants, hypothèse d'abord avancée par l'étude des inversions chromosomiques (COLUZZI et al. 1979).

Les marqueurs microsatellites permettent également l'étude de la structure génétique spatiale des populations au sein d'une espèce donnée. L'analyse des variations de fréquences alléliques peut mettre en évidence l'existence de populations distinctes à l'intérieur de la zone étudiée, et permettre d'évaluer le degré d'échange de gènes ou d'isolement reproductif entre celles-ci, ainsi qu'au sein de chacune d'elles. Ce type d'étude constitue un moyen indirect d'investigation de l'écologie des vecteurs, notamment leur dispersion dans l'espace, dont la connaissance à des implications pour la lutte antivectorielle. La structure génétique de populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* a été étudiée dans différentes zones géographiques et à différentes échelles spatiales. De

manière générale, les populations continentales des deux espèces apparaissent très peu structurées, c'est-à-dire que des échantillons géographiquement distants partagent des caractéristiques génétiques semblables. En dehors de populations insulaires très différenciées des populations continentales, en raison de la restriction des flux géniques par l'océan (MORENO *et al.* 2007; SIMARD *et al.* 1999), aucune barrière n'a été identifiée à l'intérieur du continent à l'exception de la vallée du rift tranversant l'Afrique de l'Est (KAMAU *et al.* 1999; LEHMANN *et al.* 2003). Les marqueurs microsatellites sont également utilisés dans l'étude de la structure génétique temporelle des populations, permettant d'estimer la taille des populations et ses variations au cours du temps, donc de procurer des indications sur leur maintien pendant les périodes sèches, et de suivre les effets éventuels de mesures opérationnelles de lutte antivectorielle visant à entraîner une réduction des populations. Le calcul de la taille théorique des populations, appelée effectif efficace (N_e), estime le nombre de femelles ayant participées au pool génique échantillonné à partir des variations de fréquences alléliques entre générations (WAPLES 1989). Le suivi d'une population d'*An. arabiensis* provenant de la zone sahélienne du Sénégal (SIMARD *et al.* 2000) a par exemple montré une remarquable stabilité des fréquences alléliques durant quatre années consécutives, malgré une chute drastique des abondances pendant la longue saison sèche. Ces échantillons ont produit des estimations de N_e de l'ordre de 10^3, résultat très similaire à des échantillons d'*An. gambiae* s.s. analysés au Kenya (LEHMANN *et al.* 1998). Malgré les densités très faibles généralement observées au cours de la saison sèche, ces données ont suggéré que les populations ne subissent pas de *bottleneck* ou goulot d'étranglement génétique saisonnier, c'est à dire de réduction d'abondance importante engendrant une baisse de leur diversité génétique globale par dérive génétique. L'hypothèse de dème (voir la partie IV.2.2.C) diffus relie données génétiques et observations de terrain (LEHMANN *et al.* 1998), proposant que les faibles densités de population observées sont compensées par leur mobilité, permettant le maintien d'un effectif efficace important et de dèmes occupant des aires relativement vastes.

Les marqueurs microsatellites peuvent aussi être utilisés afin de localiser des régions génomiques impliquées dans des phénotypes d'intérêt (*Quantitative Trait Loci*, QTL), parfois multifactoriels. Chez *An. gambiae*, les mécanismes de la résistance à l'infection par *Plasmodium cynomolgi* (ZHENG *et al.* 1997), la résistance métabolique au DDT (RANSON *et al.* 2000b) ainsi qu'à la perméthrine (RANSON *et al.* 2004) ont par exemple été précisés. Ils ont de plus permis d'explorer les bases génétiques de la susceptibilité de populations naturelles d'*An. gambiae* à l'infection par *P. falciparum*, par l'observation du nombre d'oocystes dans la descendance de femelles capturées sur le terrain, après un repas de sang humain parasité, couplée à l'analyse de marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du génome (NIARE *et al.* 2002; RIEHLE *et al.* 2007; RIEHLE *et al.* 2006). Plusieurs loci majeurs impliqués dans le contrôle de l'infection, notamment par les mécanismes d'encapsulation et de mélanisation des oocystes, ont pu être identifiés. La localisation de ces loci d'intérêt pourra ensuite être précisée à l'aide d'un maillage de marqueurs microsatellites plus fin, et les gènes candidats caractérisés au niveau moléculaire et fonctionnel.

Quelque soit la problématique étudiée, l'intérêt et la puissance de ces marqueurs génétiques résident dans leur polymorphisme, lié au taux de mutation de ces régions répétées et aux contraintes sélectives au loci considérés. Ces paramètres conditionnent également certaines limites de l'utilisation des marqueurs microsatellites. Leur résolution peut ainsi s'avérer trop limitée pour mettre en évidence une structuration dans l'espace faible, ou la différenciation génétique entre des taxons dont la divergence est récente. Leur neutralité sélective présumée peut également ne pas se vérifier lorsque le marqueur est situé à proximité d'un locus soumis à pression de sélection et est lié génétiquement à ce dernier, dans un processus de "*hitchhiking*". De plus, les modèles conventionnels de génétique des populations peuvent parfois produire des estimations ne reflétant pas la réalité biologique (BOSSART and PASHLEY PROWELL 1998). En effet, alors que ces modèles impliquent des hypothèses sous-jacentes d'uniformité de paramètres démographiques tels que le taux de dispersion, ces derniers varient fréquemment dans le temps et l'espace, en réponse à l'hétérogénéité environnementale abiotique et biotique. Ainsi, si la structure de

populations peut-être décrite en terme de proximité génétique entre échantillons, son interprétation en terme de flux géniques est plus délicate, pouvant être biaisée du fait par exemple d'une instabilité démographique (*e.g.* expansion récente de la population) ou d'une hétérogénéité du N_e entre échantillons (DONNELLY *et al.* 2002). De manière générale, la structure génétique observée à un moment donné réflète non seulement les flux géniques actuels, mais également l'histoire démographique des populations, dont les contributions respectives ne peuvent pas être séparées sans avoir recours à d'autres marqueurs génétiques tels que l'ADN mitochondrial et l'ADN ribosomal (CARNEVALE *et al.* 2009). Une autre limite concerne l'échelle spatiale considérée, l'étude d'échantillons géographiquement très éloignés risquant de ne pas être informative en occultant la structuration génétique à plus petite échelle.

IV. Le cas du Niger

IV.1. Situation éco-climatique et contexte du paludisme

IV.1.1. Situation éco-climatique du Niger

La République du Niger, se situe sur une large gamme de latitude de 11°37' à 23°23' de latitude nord (Figure 11). Cette situation permet d'apprécier la transition éco-climatique depuis les savanes soudaniennes d'une mince frange sud du pays, vers la zone sahélienne centrale, et enfin les zones pré-désertique à désertique couvrant une grande partie nord du pays. Le relief est peu contrasté, l'altitude oscille entre 200 et 500 mètres au sud-ouest, augmentant progressivement vers le nord-est entre 800 et 1000 mètres au niveau de plateaux tabulaires. Le massif de l'Aïr, situé dans le centre-nord du pays, présente une altitude moyenne de 500 à 900 mètres.

Le climat y est tropical continental avec trois saisons :

- Une saison des pluies de juin à octobre, liée à la mousson africaine ;
- Une saison sèche et froide d'octobre à février ;
- Une saison sèche et chaude jusqu'en juin accompagnée d'un vent d'est, l'Harmattan.

La zone soudanienne reçoit en moyenne de 500 à 800 mm de précipitations annuelles, la zone sahélienne est comprise entre les isohyètes 500 mm au sud et 250 mm au nord, tandis que plus au nord se trouve la zone désertique caractérisée par des pluies très limitées et particulièrement variables d'une année sur l'autre (Figure 12). Le durée de la saison pluvieuse ainsi que le nombre de jours de pluie augmentent également vers le sud du pays : de quelques jours concentrés au mois d'août dans l'extrême nord (Bilma), une vingtaine de jours étalés sur 2-3 mois dans la région aride d'Agadez, une quarantaine de jours étalés sur

4-5 mois dans la zone sahélienne, jusqu'à près de 70 jours de pluie étalés sur environ 7 mois au niveau de la pointe sud du pays (Gaya).

Figure 11. Carte du Niger indiquant les pays frontaliers, les sept régions administratives, les principales villes, ainsi que le réseau hydrographique. La plupart des cours d'eau représentés dans le nord et le centre du pays sont temporaires (Source : Organisation des Nations Unies, carte n°4234).

Le type de végétation ainsi que les pratiques agro-pastorales sont liés à la pluviométrie. Ainsi, les savanes arbustives du sud sont propices aux cultures pluviales saisonnières (principalement mil, sorgho, arachide et niébé), tandis les steppes sahéliennes du centre du pays sont les zones de prédilection des éleveurs de bétail, même si l'agriculture y est également pratiquée. Plus au nord, la végétation épineuse et le tapis herbacé se raréfient progressivement, pour laisser place au désert du Sahara. Le réseau hydrographique est

constitué du fleuve Niger qui traverse l'extrémité sud-ouest sur une distance d'environ 500 km, du Lac Tchad à l'extrémité sud-est et de la Komadougou Yobé, fleuve marquant la frontière avec le Nigeria sur 150 km à l'est du pays. Le reste des points d'eau est constitué par les nombreuses mares présentes dans le sud et le centre du pays. On distingue les mares permanentes, qui perdurent tout au long de l'année, même si leur niveau peut varier, des mares temporaires qui croissent durant la saison des pluies, puis diminuent jusqu'à s'assécher au cours de la longue saison sèche. De plus, de nombreux cours d'eau temporaires sont mis en eau de manière sporadique suite à de fortes pluies, et restent asséchés durant une majeure partie de l'année. L'existence de périmètres irrigués, principalement dans la zone du fleuve Niger, ainsi que quelques retenues artificielles sont également à noter. Enfin, des affleurements de nappes phréatiques permettent dans certaines zones des cultures de contre saison.

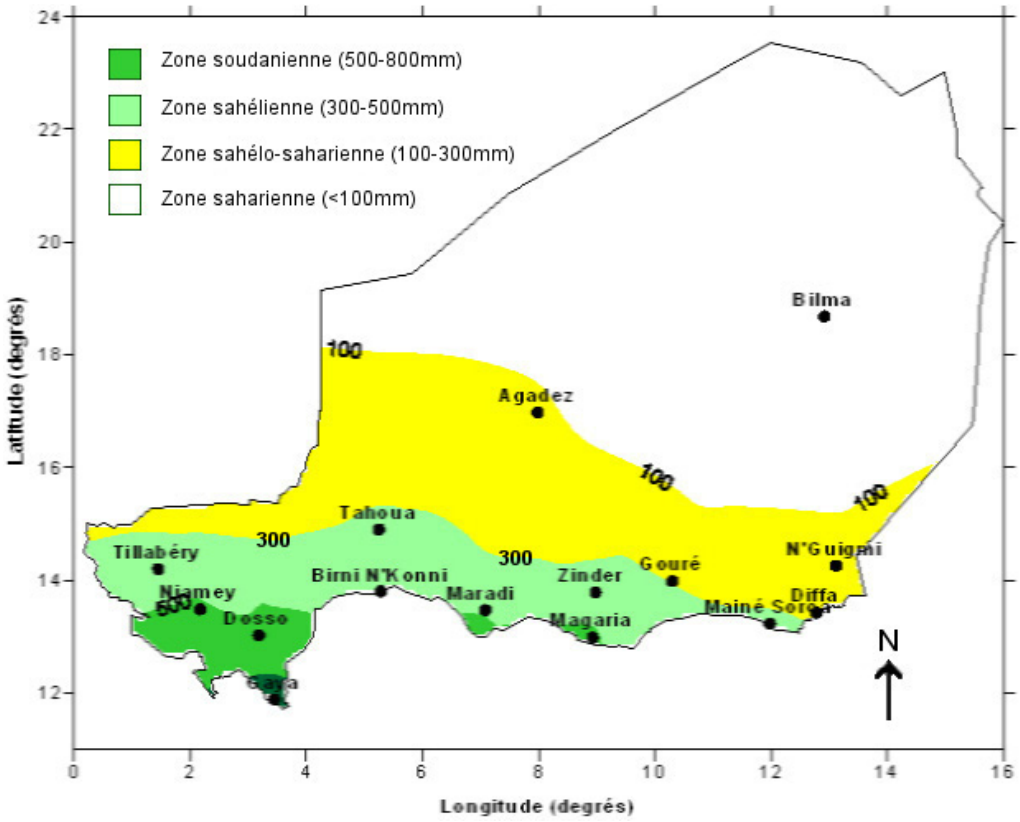


Figure 12. Les zones éco-climatiques du Niger, définies par les pluviométries cumulées annuelles. (Source : I. Jeanne, CERMES, d'après données DMN).

IV.1.2. Contexte du paludisme

A/ Généralités

Le paludisme constitue une endémie majeure au Niger, principale cause de morbidité et de mortalité chez les jeunes enfants, avec les maladies diarrhéiques et les infections respiratoires (PNLP 2006). Entre 2001 et 2005, une moyenne de 850.000 cas annuels de paludisme présumé ont été notifiés dans les formations sanitaires, mais l'absence de confirmation biologique empêche une estimation précise du nombre réel de cas. De plus, le nombre de cas de paludisme est très variable, tant dans l'espace que le temps, reflétant une hétérogénéité de l'intensité de transmission de *P. falciparum*. Cette disparité résulte des interactions entre les différentes composantes du système épidémiologique, et a pour principal moteur les importants contrastes écologiques et climatiques observés au Niger. Ceux-ci conditionnent en effet la répartition des peuplements humains, la dynamique des populations de vecteurs, et le développement parasitaire. Les plus fortes densités de peuplement humain sont observées dans les zones suffisamment humides pour permettre les cultures, dans une bande au sud du pays couvrant la zone soudanienne ainsi qu'une partie de la zone sahélienne (figure 13). Ainsi, une très grande majorité de la population Nigérienne est concentrée dans cette zone, avec des clusters de grande densité (> 50 habitants/km²) dans la région de Niamey à l'ouest, ainsi que dans une large zone centrale entre Tahoua et Zinder, dans le prolongement des zones densément peuplées du nord du Nigéria. A l'inverse, au délà de la zone sahélienne, la présence humaine est beaucoup plus limitée et de vastes zones sont inhabitées, uniquement traversées par de petits groupes de populations nomades. Les variations écologiques ont bien entendu également une grande influence sur les populations de vecteurs de *Plasmodium*, directement en raison de la nécessité de collections d'eau pour la ponte et le développement larvaire ainsi que de leur tolérance plus ou moins importante aux fortes températures/faibles humidités relatives, mais

aussi indirectement du fait que les vecteurs majeurs vivent en étroite association avec l'homme.

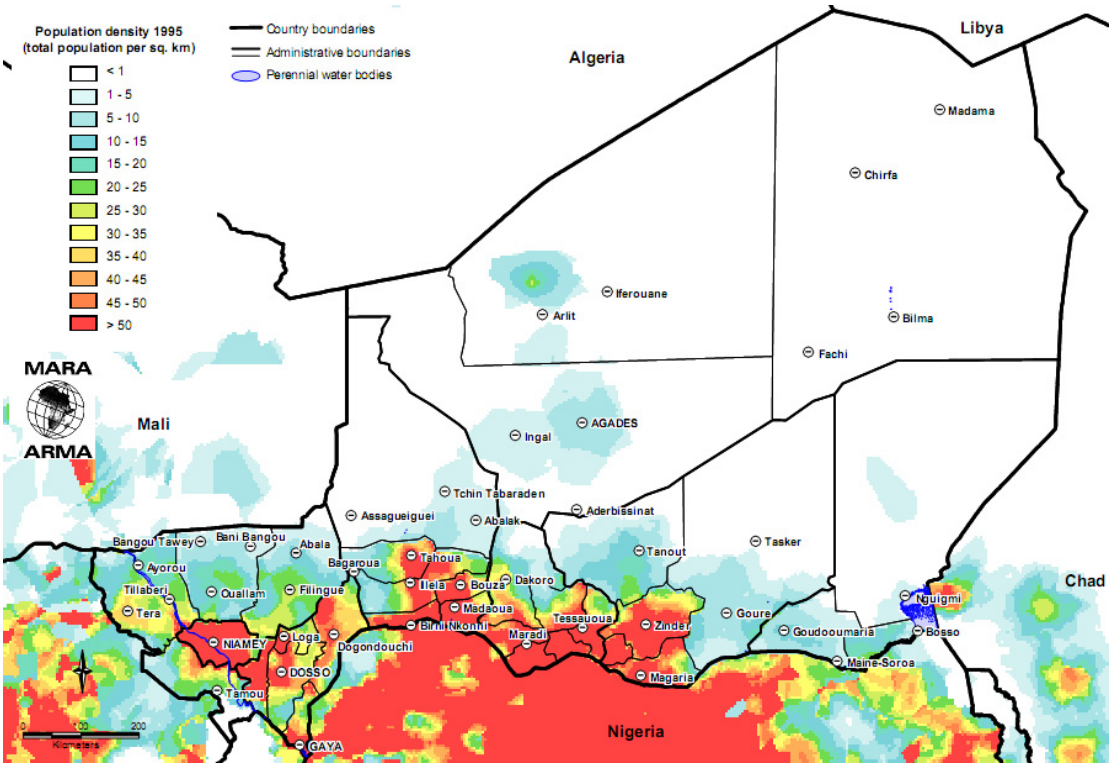


Figure 13. Estimation de la densité des populations humaines au Niger en 1995. Modèle de distribution spatiale développé par U. Deichmann utilisant les données de recensement des populations, redistribuées en fonction des villes et du réseau routier. (Source : Projet MARA/ARMA)

Les infections par *P. falciparum* prédominent largement au Niger, parfois associé à *P. malariae* ou *P. ovale.* Les prévalences parasitaires peuvent être très contrastées suivant les zones, ayant permis la distinction de trois strates épidémiologiques (JULVEZ *et al.* 1992) :

- Une zone hyper-endémique au sud, près de la frontière béninoise et le long du fleuve Niger, où la prévalence parasitaire est importante, pouvant dépasser 50% chez les enfants (1-9 ans) y compris pendant les saisons sèches, témoignant d'une transmission permanente ;

- Une zone méso-endémique dans les savanes soudano-sahéliennes centrales, où la parasitémie persiste pendant la saison sèche à des niveaux variables, mais où la recrudescence en saison des pluies est nette ;
- Une zone hypo-endémique dans la vaste région saharienne, où les parasitémies sont très faibles à nulles, avec une forte disparité spatiale, saisonnière et interannuelle. C'est également la zone à plus fort risque épidémique.

B/ Les vecteurs du paludisme au Niger

Les premières études entomologiques menées notamment par l'Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (OCCGE) dans les années 1960 (BRUNHES *et al.* 1966; DYEMKOUMA 1961; DYEMKOUMA 1963; ESCUDIE and HAMON 1961) ont été complétées ponctuellement. Les prospections entomologiques menées durant les années 1990 ont identifiées 19 espèces d'anophèles sur le territoire nigérien (JULVEZ *et al.* 1998). Les vecteurs majeurs sont *An. gambiae* s.l., retrouvé dans la majeur partie des savanes soudaniennes et sahéliennes, et *An. funestus* dans la région du fleuve ainsi qu'à proximité de Zinder (HAMON *et al.* 1966; JULVEZ *et al.* 1992). Cependant, *An. funestus* a disparu de la zone sahélienne du Niger suite à des sécheresses prononcées survenues en 1972, 1983 et 1991-92, et n'était toujours pas retrouvé en 1995 malgré des pluies abondantes (JULVEZ *et al.* 1997b; MOUCHET *et al.* 1996). Il faudra attendre 2003 pour noter à nouveau la présence d'*An. funestus* dans le sahel Nigérien (LABBO *et al.* 2004). *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont les deux seules espèces du complexe gambiae rencontrées au Niger (COZ 1973; JULVEZ *et al.* 1998; STAFFORD SMITH 1981). Des études cytogénétiques ont montré la présence d'*An. gambiae* s.s. dans le sud, depuis la zone du fleuve Niger à l'ouest, jusqu'au centre-est du pays (COLUZZI *et al.* 1979; COZ 1973). *An. arabiensi*s a été retrouvé en sympatrie avec *An. gambiae* s.s. dans le sud, en différentes proportions selon les zones et saisons, mais est la seule espèce présente dans les régions les plus arides au nord du pays (STAFFORD SMITH 1981). La présence d'*An. gambiae* s.l. est conditionnée par la présence de collections d'eau pluviale nécessaires à la ponte et au

développement larvaire. Suivant les années et le régime de pluies, la limite nord de l'aire d'extension d'*An. arabiensis* est donc très fluctuante. Dans la plus grande partie du pays, excepté au sud, la plupart des eaux de surface disparaissent en saison sèche et *An. gambiae* s.l. est très peu abondant pendant une partie plus ou moins longue de l'année. La stratégie de survie de l'espèce durant la saison sèche n'est pas connue. Une estivation, avec dissociation gonotrophique a été décrite au Soudan durant la saison sèche (OMER and CLOUDSLEY-THOMPSON 1970), mais ce phénomène n'a jamais été confirmé. D'autre part, plusieurs études ont observé *An. gambiae* s.l. au niveau de points d'eau permanents en zone sahélienne, notamment des puits, à partir desquels il semble se disperser durant la saison des pluies (JULVEZ *et al.* 1992). Le vent de mousson, qui accompagne la montée du front intertropical (FIT) joue probablement un rôle dans cette dispersion. Cette hypothèse pourrait expliquer qu'*An. gambiae* ait été retrouvé dans plusieurs endroits de la zone saharienne, notamment dans le massif de l'aïr, dans des oasis au Tchad (RIOUX 1960) et peut-être à Bilma au Niger où s'est produite une épidémie de paludisme en 1991 (DEVELOUX *et al.* 1994). Ces situations méritent d'être mentionnées, mais elles sont tout de même relativement rares, et *An. gambiae* ne peut pas s'implanter durablement dans ces environnements, même s'il a pu y accomplir quelques cycles.

D'autres espèces, vecteurs locaux ou accidentels, ont été identifiées, dont *An. nili* dans la région traversée par le fleuve Niger, à Ayorou et Niamey (BAUDON *et al.* 1986; JULVEZ *et al.* 1997a), *An. pharoensis* dans l'ouest et le centre et *An. ziemanni* à l'est, dans la région de Zinder (HAMON *et al.* 1966). De plus, *An. hervyi*, espèce uniquement retrouvée dans la zone de Guidimouni, près de Zinder, a été récemment décrite (BRUNHES *et al.* 1999) après avoir été confondue avec *An. salbaii*, espèce exploitant des gîtes d'eau salée (HAMON *et al.* 1966). Les déterminants environnementaux de cette aire de répartition limitée sont inconnus, d'autant plus que le stade larvaire de l'espèce n'est pas encore décrit. Il semble cependant qu'*An. hervyi* ne joue pas de rôle dans la transmission locale de *P. falciparum* (LABBO *et al.* 2009) (Annexe 5). D'autre part, des espèces paléarctiques peu ou pas vectrices telles qu'*An.*

multicolor et *An. hispaniolia*, principalement présentes dans les pays d'Afrique du Nord, ont été sporadiquement capturées dans le nord du Niger (JULVEZ *et al.* 1998).

IV.2. Politique nationale de lutte et mise à l'échelle des nouvelles stratégies

IV.2.1. Politique nationale de lutte contre le paludisme

La lutte contre le paludisme est une priorité pour le Niger qui a adhéré à l'initiative RBM dés son lancement, et a redéfini son plan stratégique de lutte en conséquence. Le Programme National de lutte contre le Paludisme (PNLP) du Niger, créé en 1984, a pour principale mission de concevoir, coordonner et évaluer la politique nationale de lutte antipaludique (PNLP 2006). Conformément à la déclaration d'Abuja (WHO 2000), les actions de lutte visent la réduction de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme, en priorité dans les populations vulnérables que constituent les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. Les différentes stratégies de lutte mises en place concernent (1) la prise en charge des cas ; (2) la prévention du paludisme chez les femmes enceintes ; (3) la lutte contre les vecteurs du paludisme ; (4) la prévision, prévention et gestion des épidémies ; (5) la communication et la mobilisation sociale. Les objectifs opérationnels se calquent sur ceux du plan stratégique global de l'initiative RBM (RBM 2005). Ces interventions s'effectuent en collaboration avec un grand nombre de partenaires financiers et techniques, tant au niveau national qu'international, participant au financement, à la planification, à la mise en œuvre et au suivi des actions de lutte et de contrôle.

IV.2.2. Nouvelles stratégies et mise à l'échelle

Les outils de lutte contre le paludisme les plus récents sont utilisés au Niger. Ainsi la dernière génération de médicaments curatifs, les traitements combinés à base d'artémisinine (ACT, *Artemisinin Combined Therapies*), ont été introduits à partir de 2007 et constituent le

traitement des cas de paludisme de première ligne. Des financements extérieurs ont permis la fourniture de ces traitements et la mise en place de la gratuité des soins pour les enfants dans les formations sanitaires. Concernant la lutte contre les vecteurs et la transmission, l'utilisation de moustiquaires est courante au Niger, mais le programme national de distribution mené en 2005 a permis en un temps très court de faire progresser considérablement le taux de couverture en moustiquaires imprégnées longue-durée dans les populations (THWING *et al.* 2008), et de mettre à l'échelle cet outil efficace de contrôle du paludisme.

La Fédération Internationale de la Croix Rouge et du croissant rouge (FICR), les programmes de lutte contre le paludisme et d'éradication de la poliomyélite, organes du ministère de la santé du Niger, ainsi que de nombreux autres partenaires ont en effet mis en œuvre ce qui devînt la plus grande distribution gratuite de LLIN jamais effectuée, grâce à un financement du FMSTP de 12 millions de dollars (Projet NGR-405-G03M) (GFATM/IFRC 2006). En décembre 2005, plus de deux millions de LLINs ont été réparties dans 3850 sites de distribution, répartis sur le territoire en fonction des densités de populations humaines, puis distribués aux populations cibles, à l'exception de Niamey, capitale du pays, où la distribution a été organisée en mars 2006. Les moustiquaires distribuées ont été des Permanet® 2.0 (Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland) imprégnées de deltaméthrine à 55 mg/m². Le groupe de population ciblé par le programme, les enfants de moins de cinq ans (dont le nombre était estimé à 2,9 millions) est identique à celui du programme de vaccination contre la poliomyélite, et leur organisation conjointe à été décidée. Cette stratégie a permis de maximiser les chances de réussite de la distribution de moustiquaires, en bénéficiant de l'expérience des campagnes de vaccination de masse et en permettant le recrutement actif des enfants. En effet, le système retenu impliquait le passage des personnes chargées d'administrer le vaccin oral de porte-à-porte dans les villages, qui avaient également pour mission d'enjoindre les mères d'enfants vaccinés à se présenter aux postes de distribution fixe afin de recevoir une LLIN chacune. Les mères concernées ont reçues un marquage à l'encre indélébile ainsi qu'un bon (voucher) qu'elles devaient remettre

en échange de la moustiquaire, en se rendant au poste de distribution à la date prévue. Les femmes enceintes ont constitué la seconde cible du programme, car bien que non ciblées directement, il est probable qu'une majorité en ait bénéficié du fait qu'elles partagent généralement le couchage avec leurs jeunes enfants (GFATM/IFRC 2006). De même, en présence de plusieurs jeunes enfants au sein d'un foyer, les espaces de couchage, donc les moustiquaires, sont partagés et permettent la protection de tous. De plus, à la fin de la campagne de distribution, des informations sur l'intérêt, l'utilisation correcte, ainsi que la bonne conservation des LLIN ont été diffusées, principalement par le biais de volontaires de la croix rouge lors de séances de sensibilisation (HASKEW 2006), ainsi que par des radios locales et nationales.

Un volet de suivi et d'évaluation à été inclus au programme, de manière à apprécier sa mise en œuvre, l'atteinte des objectifs opérationnels en terme de couverture et d'utilisation des LLINs, ainsi que les effets obtenus sur la transmission palustre et ses conséquences sur la santé des populations. Ces études ont impliquées plusieurs institutions, dont le PNLP, le CERMES, le SNIS (Système National d'Information Sanitaire) et le CDC (Center for Disease Control, Atlanta). Le projet de suivi mené au CERMES, dont sont issus une partie des résultats présentés dans cette thèse, sera détaillé dans la partie suivante exposant les méthodes utilisées. Les résultats des enquêtes de couverture et d'utilisation des LLINs seront détaillés et discutés en résultats complémentaires.

V. Méthodologie

V.1. Aperçu du projet de suivi de la transmission, le projet "OMNI"

Dans le cadre du suivi et de l'évaluation du programme de distribution de moustiquaires imprégnées, financé durant les deux premières années par le FMSTP (quatrième round) puis la dernière année par l'OMS, le CERMES a été chargé d'organiser et de mener à bien (1) des études longitudinales épidémiologiques et parasitologiques dans des sites sentinelles, ainsi que (2) des enquêtes transversales de suivi de la transmission palustre et des populations de vecteurs au niveau communautaire. Au sein du CERMES, cet important projet a impliqué l'unité de parasitologie et d'entomologie, l'unité "santé, environnement et climat" ainsi que l'unité d'épidémiologie. Considérant l'ampleur du projet, un comité scientifique composé des acteurs locaux du projet (CERMES, PNLP, OMS-Niger) et d'experts internationaux se réunissant annuellement avait pour mission le suivi de l'étude et la proposition de réaménagements techniques utiles. Le suivi épidémiologique longitudinal a concerné 44 centres de santé intégrés (CSI) au niveau périphérique, répartis sur tout le territoire en fonction des densités de populations. Un système de recueil régulier d'échantillons sanguins et de transmission de données de consultations et de paludismes présumés, ainsi que de relevés de paramètres météorologiques a été mis en place. Les données cliniques et météorologiques étaient transmises par satellite à l'aide de balises Argos, et centralisées au niveau d'un serveur informatique accessible à distance. Les études parasitologiques et entomologiques transversales ont quant à elles reposé sur la collectes d'échantillons et de données dans douze villages, à raison de trois passages par an effectués entre 2005 et 2007.

Dans le cadre de ce projet multidisciplinaire, j'ai été en charge de la mise en œuvre des études entomologiques, avec le Dr Jean-Bernard Duchemin, chef de l'unité de parasitologie,

et son adjoint Rabiou Labbo. Ces activités ont constitué une grande partie de mon travail de thèse, les méthodes concernées sont détaillées dans la partie suivante.

D'une manière générale, pour tous les paramètres étudiés, le caractère national de l'opération n'a pas permis de disposer de zones contrôles où les LLINs n'auraient pas été distribuées. La stratégie employée a donc consisté en un suivi temporel des différents paramètres d'intérêt, depuis la saison des pluies 2005 ayant précédé la distribution, effectuée en décembre de la même année, jusqu'à la saison des pluies 2007, 18 mois après l'intervention. Cette stratégie implique qu'il est difficile de démontrer formellement l'existence d'une relation de cause à effet entre l'opération de lutte et la variation d'un indicateur subséquemment observée. Un intérêt particulier a donc été porté tout au long du projet à l'analyse des différents facteurs potentiellement impliqués dans ces variations. La source majeure d'hétérogénéité interannuelle de la transmission palustre est d'origine climatique, mais des facteurs tels que d'autres interventions de contrôle du paludisme ont pu également avoir une influence.

V.2. Suivi des populations de vecteurs

V.2.1. Plan et méthodes d'échantillonnage

Le choix des villages où mener les collectes de la faune culicidienne ainsi que le suivi parasitologique a été fait dans un souci de représentativité nationale. La situation climatique, déterminant la répartition des populations tant humaines que vectorielles, a fait choisir un nombre suffisant de sites répartis dans la bande sahélienne du Niger. Les centres urbains n'ont pas été considérés lors de ce suivi (En dehors de quelques résultats préliminaires sur la mutation *kdr* dans les populations d'*An. gambiae* à Niamey), partant du constat que la majorité de la population nigérienne vit en zone rurale. Les douze sites sélectionnés sont

répartis le long d'un transect ouest-est d'environ 1700 km traversant le pays au niveau de la zone sahélienne, qui abrite une grande partie de la population nigérienne et présente une forte hétérogénéité de niveaux de transmission (Figure 14). Ce transect correspond également aux principaux axes routiers du pays, mis à profit afin de faciliter le déroulement des missions de collecte.

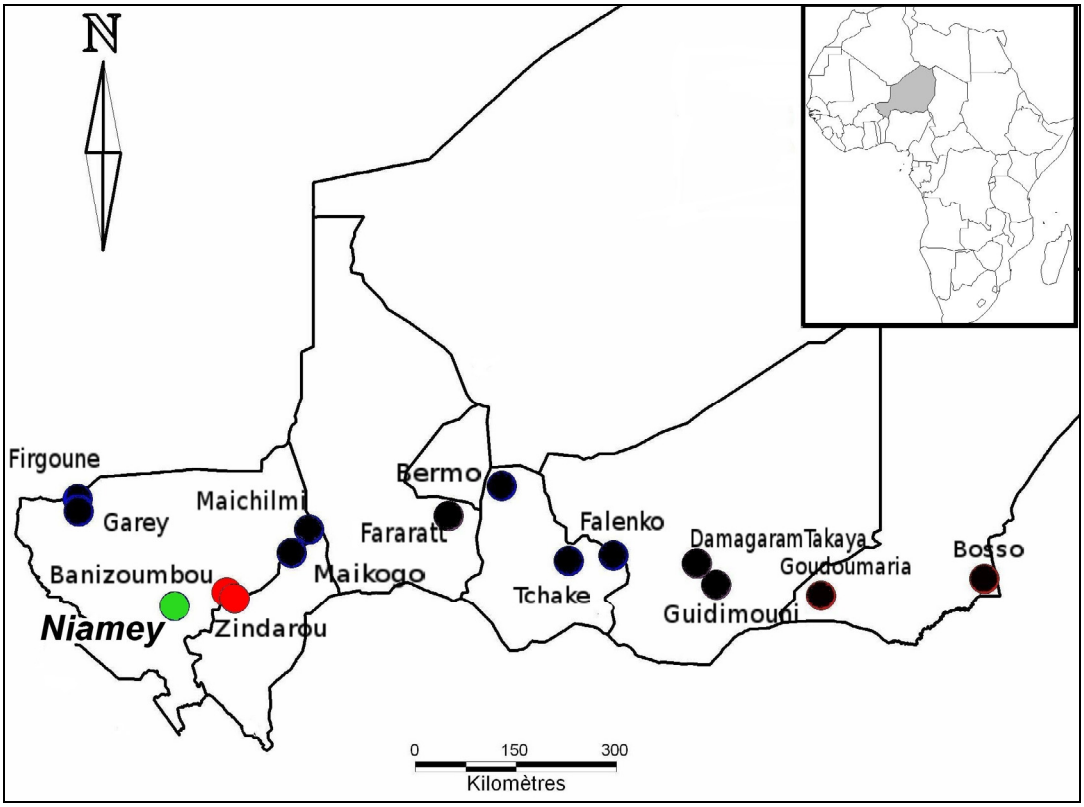


Figure 14. Localisation des sites d'étude. Les douze sites du suivi transversal mené dans le cadre du projet sont indiqués par des cercles noirs, les deux sites étudiés de manière bimensuelle par le CERMES dans le cadre du projet AMMA par des cercles rouges, et la capitale, Niamey, par un cercle vert.

Durant les deux premières années du suivi transversal (2005-2006), les missions d'échantillonnage des vecteurs ont été effectuées dans les douze sites (Figure 15):

- en août-septembre, durant la saison des pluies et autour du pic d'abondance annuel
- en décembre-janvier, durant la saison sèche et fraiche
- en mars-avril-mai, durant la saison sèche et chaude

En revanche le schéma d'échantillonnage a quelque peu changé lors de la troisième année (2007), d'après les recommandations du conseil scientifique du projet, et s'est recentré sur l'étude de six des douze sites (Firgoune, Maikogo, Falenko, Fararatt, Guidimouni et Bosso) et sur la période de transmission. L'échantillonnage de saison sèche et chaude a été abandonné lors de la dernière année du suivi car les rendements de captures observés en 2006 ont été extrêmement faibles, voir nuls, et montraient l'absence de transmission en cette saison dans la plupart des sites investigués.

De plus, deux villages étudiés dans le cadre du projet AMMA (Analyse Multidisciplinaire de la Mousson Africaine), Banizoumbou et Zindarou (Figure 14), ont été ajoutés à ce plan d'échantillonnage. Ces deux villages sont proches, séparés par 30km, mais présentent néanmoins des populations de vecteurs (BOMBLIES *et al.* 2009) et profils de transmission de *P. falciparum* différents (CERMES, non publié). Dans ces sites, un suivi longitudinal bimensuel de la transmission à été mené à partir de 2003 et a permis des analyses complémentaires.

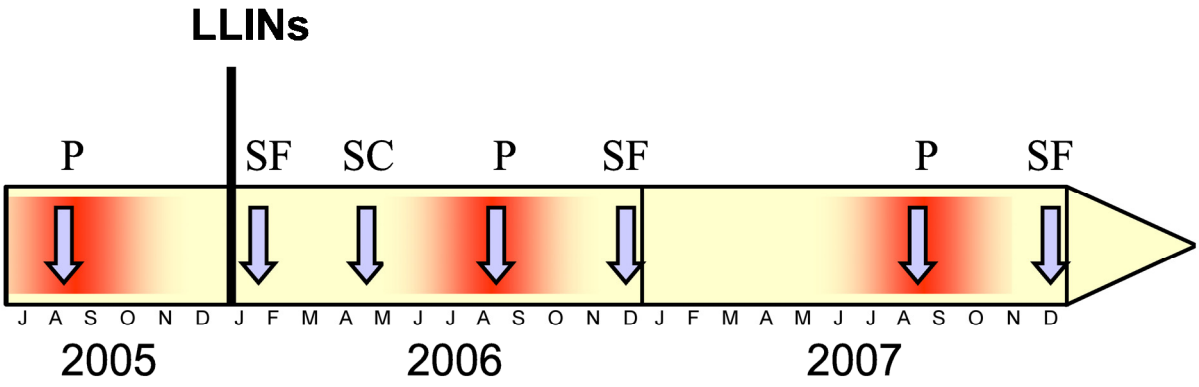


Figure 15. Plan d'échantillonnage du suivi entomologique transversal, de mi 2005 à fin 2007. La barre verticale indique la mise en place des moustiquaires. Les flèches grises indiquent les évènements de collecte, la saison correspondante est indiquée au dessus (P: saison des pluies, SF: saison sèche et fraiche, SC: saison sèche et chaude). Les zones représentées en rouge correspondent aux pics estimés des abondances vectorielles et de la transmission palustre, durant la saison pluvieuse.

Toutes les missions de terrain ont suivi la même méthodologie d'échantillonnage de la faune culicidienne adulte, approuvée par le comité national d'éthique du Niger, comprenant :

- la collecte de la faune au repos à l'intérieur de cinq habitations, par aspersion d'insecticides pyréthrinoïdes (Mobil insecticide, Mobil Oil Nigeria, Lagos, Nigeria) en début de matinée ;
- la collecte des femelles à la recherche de sang, par capture à l'atterrissage sur des volontaires adultes, dont trois à l'intérieur et trois à l'extérieur des habitations, de 19h à 7h le lendemain matin, pendant deux nuits consécutives ;
- la collecte à l'aide de pièges lumineux de type CDC, à raison de deux à l'intérieur et deux à l'extérieur des habitations, également pendant deux nuits consécutives.

Après identification morphologique (GILLIES and COETZEE 1987; HERVY *et al.* 1998), les spécimens ont été stockés à sec dans des plaques 96 puits, à température ambiante dans des boites contenant du dessicant (silicagel), puis au congélateur entre -20° et -30°C une fois transférés au laboratoire. Sur le terrain, les ovaires d'un sous-échantillon d'*An. gambiae* s.l. femelles à jeun ou fraichement gorgées ont été étalés à frais sur lame puis séchés en vue de la détermination du taux de parturité.

V.2.2. Méthodes de laboratoire et analyses

Une fois les anophèles collectés sur le terrain, identifiés morphologiquement, transportés au laboratoire et stockés au congélateur, les analyses prévues dans le cadre du suivi des populations de vecteurs au décours de la distribution de LLIN ont visé :

- la quantification des populations des différentes espèces ;
- l'estimation des taux de piqûre sur l'homme (anthropophagie) ;
- l'étude des comportements de piqûre et de repos (endo/exophagie, endo/exophilie) ;
- la détermination des taux de parturité ;

- la détermination des taux d'infection à *P. falciparum* ;
- l'évaluation du niveau de résistance des populations d'*An. gambiae* s.l. aux insecticides ;
- l'étude de la structure génétique des population d'*An. gambiae* s.l.

A/ Caractérisation des populations de vecteurs et de la transmission

Le taux de piqûre sur homme des espèces anophéliennes a été estimé grâce aux captures à l'atterrissage, exprimé en nombre de piqûres quotidien par homme. Il a également permis d'évaluer le degré d'endophagie par la comparaison des piqûres reçues à l'intérieur et à l'extérieur des habitations (taux d'endophagie = nombre de piqûres à l'intérieur / nombre total de piqûres). Concernant l'endophilie, le rapport des captures par aspersion de pyrethrinoïdes à l'intérieur des maisons sur la somme totale des moustiques capturés à l'atterrissage, peut être considéré comme un marqueur de la proportion de la faune se reposant à l'intérieur des maisons après s'être gorgée. Il correspond au nombre de femelles capturées au repos à l'intérieur par femelles capturée à l'atterrissage (intérieur et extérieur confondus). Cet indicateur ne permet pas d'estimer la proportion de femelles quittant les habitations après un repas de sang, comme cela peut être fait à l'aide de cases-pièges avec pièges de sortie, mais renseigne les variations relatives du caractère endophile des populations.

La détermination du taux de parturité des échantillons a été effectuée par la technique classique d'observation microscopique des trachéoles ovariennes (DETINOVA 1963). Les femelles ayant déjà pondu sont distinguées de celles n'ayant jamais pondu. Le taux de parturité, défini comme la proportion de femelles ayant déjà pondu au moins une fois, fournit un indice basique estimant l'âge de la population échantillonnée.

L'étude de l'infection des vecteurs par *P. falciparum* a impliqué la mise en œuvre de la technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) permettant la détection de la protéine circumsporozoitaire (CSP) spécifique de *P. falciparum* (BURKOT *et al.* 1984; WIRTZ *et al.* 1987). La CSP est une protéine de surface sécrétée par les sporozoites dés le stade

d'oocyste âgé (BOUDIN *et al.* 1988). Afin d'estimer au mieux la prévalence de femelles infectées par des sporozoites matures au niveau des glandes salivaires, donc potentiellement infectantes, les spécimens ont été coupés au niveau des pattes antérieures et uniquement les portions tête-thorax ont été analysées (BEIER *et al.* 1990). Les spécimens ont été considérés positifs lorsque l'absorbance, déterminée à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA (Biorad), était supérieure au double de la moyenne des témoins négatifs de la plaque (BEIER *et al.* 1988). Tout spécimen déterminé positif était testé une seconde fois afin de confirmer la présence de CSP au niveau des glandes salivaires. Le pourcentage de femelles infectées parmi les échantillons est présenté, accompagné des intervalles de confiance à 95% calculés dans OpenEpi (DEAN *et al.*). Les taux d'infection ont également été combinés aux nombres de piqûres mesurés afin de produire une estimation du taux d'inoculation entomologique (TIE journalier = prévalence CSP x nombre de piqûres par homme par jour), ainsi que du risque d'infection (probabilité r), d'après la formule $r = 1 - e^{-h.t}$ (KRAFSUR and ARMSTRONG 1978), avec le taux d'inoculation h et la durée considérée en jours t.

La grande majorité du travail effectué au laboratoire a concerné le complexe d'espèces *An. gambiae* s.l., dont l'étude nécessite avant tout la détermination des espèces en présence à l'aide de méthodes de diagnostic moléculaires. En vue de disposer de suffisamment de matériel génétique pour mener les différentes analyses moléculaires, l'ADN des femelles sélectionnées a été extrait à l'aide de Chelex-100 (Voir chapitre 3, partie "materials and methods" pour plus de détails). Lorsque ce travail a débuté, la méthode de diagnostic des espèces du complexe par PCR multiplex (SCOTT *et al.* 1993) était utilisée en routine au CERMES, permettant de séparer *An. gambiae* s.s. d'*An. arabiensis*, en revanche la mise en œuvre de la PCR multiplex de détermination des formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. (FAVIA *et al.* 2001) posait de sérieuses difficultés, sans que leur cause n'ai pu être clairement identifiée. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) récemment décrite (SANTOLAMAZZA *et al.* 2004) permettant en une seule amplification et digestion enzymatique la distinction d'*An. arabiensis* et des

deux formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. Cette méthode de diagnostic est tout à fait adaptée à l'étude d'An. gambiae s.l. au Niger, la présence des autres espèces du complexe au Niger étant très improbable en raison de leurs aires de distribution réduites ou restreintes au milieux côtiers (COETZEE *et al.* 2000), et du fait qu'elles n'aient pas été mentionnées par les études antérieures de la faune anophélienne du Niger (JULVEZ *et al.* 1998), ni au cours d'études préliminaires menées par le CERMES dans les trois zones bioclimatiques entre 2002 et 2004 (CERMES, non publié).

*B/ Résistance d'*An. gambiae *s.l. aux insecticides*

Des tests *in vivo* de sensibilité des populations aux insecticides devaient être menés par le PNLP selon le protocole de l'OMS (WHO 1998), afin de déterminer leurs profils phénotypiques de résistance aux différentes classes d'insecticides, mais n'ont pas pu être effectués. Les effectifs parfois faibles collectés sur le terrain, ainsi que l'absence de souche sensible de référence ont notamment constitué des obstacles majeurs à leur mise en œuvre. Le niveau de résistance des populations échantillonnées a donc été évalué par l'étude de la mutation *kdr-w* (L1014P). Plusieurs raisons permettent de penser qu'une bonne estimation de l'ampleur des phénomènes de résistance aux pyréthrinoïdes est fournie par la seule étude de la fréquence de la mutation *kdr*. En effet, elle semble constituer le mécanisme majeur impliqué dans la résistance aux pyréthrinoïdes, même si des mécanismes métaboliques peuvent exister dans certaines populations. Une bonne corrélation entre la présence de la mutation *kdr-e* et le phénotype de résistance au DDT et au pyréthrinoïdes a été montrée dans plusieurs populations d'*An. gambiae* (RAMPHUL *et al.* 2009; REIMER *et al.* 2008). Ce marqueur génétique est de plus tout à fait adapté à la détection précoce de la résistance, lorsque la mutation est présente à faible fréquence dans les populations (KELLY-HOPE *et al.* 2008), n'engendrant pas encore d'effet significatif sur leur phénotype de résistance, tel que détecté par les bio-essais (CHANDRE *et al.* 2000). La détection de la mutation *kdr-w* dans les échantillons a été effectué à l'aide de la méthode PCR allèle-spécifique (MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998), dont le protocole expérimental a été légèrement

modifié. La principale modification a consisté à séparer la réaction PCR multiplex en deux réactions distinctes, l'une permettant la mise en évidence de l'allèle sensible *kds* (fragment de 137 pb amplifié par les amorces Agd2-Agd4) et l'autre l'allèle muté résistant *kdr* (fragment de 195 pb amplifié par les amorces Agd1-Agd3). Les produits des ces amplifications étaient ensuite déposés côte-à-côte sur gel d'agarose à 2% lors de la migration électrophorétique (Figure 16). Ceci nous a permis d'améliorer le pourcentage de spécimens génotypés avec succès dés le premier essai, ainsi que la fiabilité du test grâce à une lecture facilitée. Nous ne disposions pas du contrôle interne constitué par le fragment de 293 pb amplifié quelque soit le génotype *kdr* lors de la PCR multiplex (couple d'amorces universelles Agd1-Agd2), cependant tout spécimen négatif pour les deux réactions ou positif pour l'allèle *kdr* a fait l'objet d'un seconde série de réactions. Le pourcentage de concordance entre différents passages pour les spécimens porteurs de la mutation a été élevé (voir chapitre 3 partie I.3.1), témoignant de la fiabilité de la méthode employée.

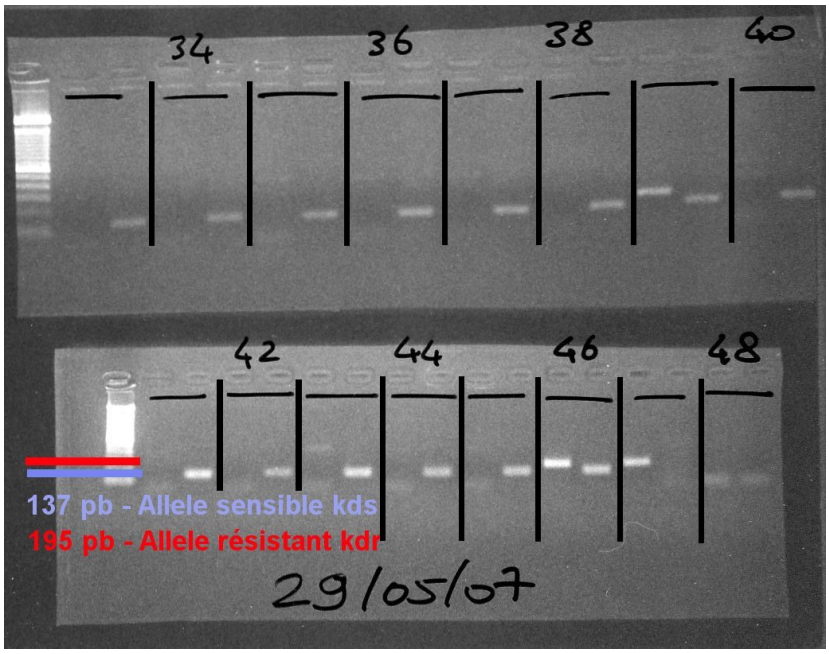


Figure 16. Exemple de migration électrophorétique de produits d'amplification de la PCR de détection des allèles *kds* et *kdr* au niveau du canal sodium d'*An. gambiae*. Le génotype de chaque individu est déterminé par la lecture des deux puits correspondants sous lumière UV, après migration à 120 volts sur gel d'agarose à 2% additionné de bromure d'éthidium. Individu 45: témoin positif homozygote *kds/kds*; individu 46: témoin positif hétérozygote

kdr/kds; individu 47: témoin positif homozygote *kdr/kdr.* Les deux derniers puits constituent le témoin négatif.

*C/ Génétique des populations d'*An. gambiae *s.l.*

L'étude de la structure génétique des populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* a été menée dans le cadre d'un projet annexe, le projet "MODIPOP" (MODIfication des POPulations de parasites et de vecteurs), ayant impliqué le CERMES, l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Ex-IMTSSA, Marseille, France), l'Instituts Pasteur de Paris (Plateforme PF8 Génotypage des pathogènes et santé publique), et l'Institut Pasteur du Cambodge. Ce projet multicentrique visait l'étude des modifications de la composition génétique des populations de parasites et de vecteurs éventuellement causées par de larges programmes de contrôle du paludisme. Le but de l'étude menée au Niger était de tester l'hypothèse d'une sélection exercée par la mise à l'échelle nationale des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action sur les populations d'*An. gambiae* s.l., ou d'une réduction de leurs effectifs suffisamment prononcée pour entrainer une baisse de la diversité génétique et/ou du N_e. Les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus sont détaillés dans le second article écrit dans le cadre de cette thèse (voir chapitre 4 partie I.2.). Toutefois nous présentons ici les méthodes et outils d'analyse employés, après une introduction des principaux concepts de génétique des populations, ainsi que les analyses complémentaires présentées à la suite de l'article.

La population est définie comme un ensemble d'individus de la même espèce peuplant une zone donnée, impliquant la possibilité théorique que tout individu puisse se croiser avec tout autre de sexe opposé, déterminée par leur probabilité de rencontre (HARTL 1994). Cependant, les individus ne sont pas répartis de manière aléatoire et homogène du fait de nombreux facteurs environnementaux (abiotiques et biotiques) ainsi que du comportement des organismes considérés, entraînant une structuration des populations dans l'espace. La subdivision au sein d'une population, avec des zones de regroupement à forte densité de

population et de zones peu voire pas peuplées, conditionne les croisements entre individus. Des unités locales de croisements peuvent ainsi être définies, également appelées dèmes, sous-populations ou populations locales, constituant l'unité de base déterminant la structure et la dynamique génétique des espèces. De nombreux paramètres influent sur la composition génétique des populations, et ses variations dans l'espace et le temps. Les variations des fréquences alléliques des marqueurs génétiques étudiés peuvent être dues au hasard en raison de la taille limitée des sous-populations, selon le phénomène de la dérive génétique, ou être dirigées par les forces évolutives que sont les mutations, les migrations et la sélection. Chaque sous-population peut donc évoluer et acquérir une originalité génétique, caractérisée par des fréquences alléliques plus ou moins différentes de celles des sous-populations voisines. Cependant, à cette diversification des sous-populations s'opposent des flux migratoires, tendant à les homogénéiser par brassage génétique.

Les relations entre fréquences alléliques et génotypiques au sein d'une population sont déterminées par le mode de croisement entre individus. Le modèle de Hardy-Weinberg (HW) permet de prédire ces relations, mais implique un certain nombre d'hypothèses, dont le croisement des individus au hasard (Panmixie), la grande taille de la population, et l'absence de migration, mutation et sélection. Lorsque ce modèle est vérifié, les fréquences alléliques et génotypiques sont constantes entre générations, constituant l'équilibre de HW. Afin de définir la structuration d'une population, on peut distinguer plusieurs niveaux de complexité : les individus (*I*), les sous-populations (*S*) et la population totale (*T*). Des indices permettent de quantifier la différenciation génétique à l'intérieur des sous-populations et entre celles-ci. Ils utilisent l'hétérozygotie observée dans les échantillons étudiés (HI) ainsi que les hétérozygoties attendues dans les sous-populations (HS) et la population globale (HT) supposées à l'équilibre de HW. On distingue :

- L'indice F_{IS} mesure la réduction d'hétérozygotie des individus à l'intérieur des sous-populations par rapport à l'équilibre de HW.
- L'indice F_{ST} mesure la réduction des hétérozygotes liée aux variations alléliques entre sous-populations. Egalement appelé index de fixation, c'est un indice de différenciation

génétique des sous-populations à l'intérieur de la population globale. Il est nul lorsque les sous-populations présentent des fréquences alléliques identiques, puis augmente à mesure que ces dernières varient, jusqu'à la valeur maximum théorique de 1. Le degré de différenciation peut être considéré comme faible jusqu'à 0,05, modéré jusqu'à 0,15, élevé jusqu'à 0,25 et très élevé au delà (WRIGHT 1978).

- L'indice F_{IT} mesure la diminution d'hétérozygotie globale de l'individu par rapport à la population totale.

L'étude du polymorphisme de marqueurs microsatellites au sein de populations peut être appliquée à de nombreuses problématiques (voir chapitre 1 partie III.2.2.C), mais c'est la recherche des relations entre sous-populations d'une même espèce qui nous a intéressé, en tant que méthode indirecte d'étude de l'écologie des populations de vecteurs, et des modifications que l'introduction de méthodes de contrôle pourraient entraîner. Il convient d'apporter un complément d'information sur certains points méthodologiques.

Des essais préliminaires d'amplification de 20 marqueurs microsatellites dinucléotidiques (AgXH53, AgXH99, AgXH678, AgXH7, Ag2H46, Ag2H325, Ag2H603, Ag2H117, Ag2H175, Ag2H197, Ag2H769, Ag2H26, Ag2H523, Ag2R7, Ag3H93, Ag3H555, Ag3H750, Ag3H817, Ag3H158, Ag3H577) ont été menés sur un sous-échantillon d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*, afin de sélectionner les marqueurs présentant le meilleur signal chez les deux espèces, et de définir les conditions optimales de réaction PCR pour chacun. Cette étape a été effectuée au CERMES, avec des amorces nucléotidiques non marquées et des migrations électrophorétiques sur gel d'agarose. Parmi ceux-ci, 12 marqueurs ont été retenus (Figure 17). Certaines de leurs caractéristiques telles que les fluorochromes employés et les températures d'hybridations sont indiquées en annexe (Annexe 2).

Toutes les réactions de PCR ont été effectuées avec un seul couple d'amorces, puis conservées au CERMES à -20°C, de quelques jours à un mois, avant d'être transportées jusqu'aux plate-formes de génotypage en France. Le traitement des produits d'amplification

a été effectué durant deux missions ponctuelles à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (ex-IMTSSA, Marseille) et à la plate forme de génotypage des pathogènes (PF8) de l'institut Pasteur de Paris. Pour ce faire, les dilutions et combinaisons optimales des différents marqueurs ont été déterminées, avant leur analyse à l'aide de séquenceurs capillaires. Les électrophorégrammes produits ont conduit à la détermination des génotypes des spécimens (voir chapitre 4 partie I.2.4). A partir des données génotypiques, les programmes informatiques GENETIX, GENEPOP, FSTAT et ARLEQUIN ont permis le calcul des estimateurs de diversité et de différenciation génétique, dont les indices F_{IS} et F_{ST}, et la détermination de leur significativité statistique (voir chapitre 4 partie I.2.5). MICRO-CHECKER a été utilisé afin d'évaluer les causes probables de déficit en hétérozygotes observé pour plusieurs marqueurs et échantillons. La structure génétique des populations échantillonnées a également été étudiée à l'aide du logiciel STRUCTURE qui permet de distinguer des sous-populations génétiquement distinctes sans information préalable sur la localisation des spécimens à l'aide de méthodes bayésiennes.

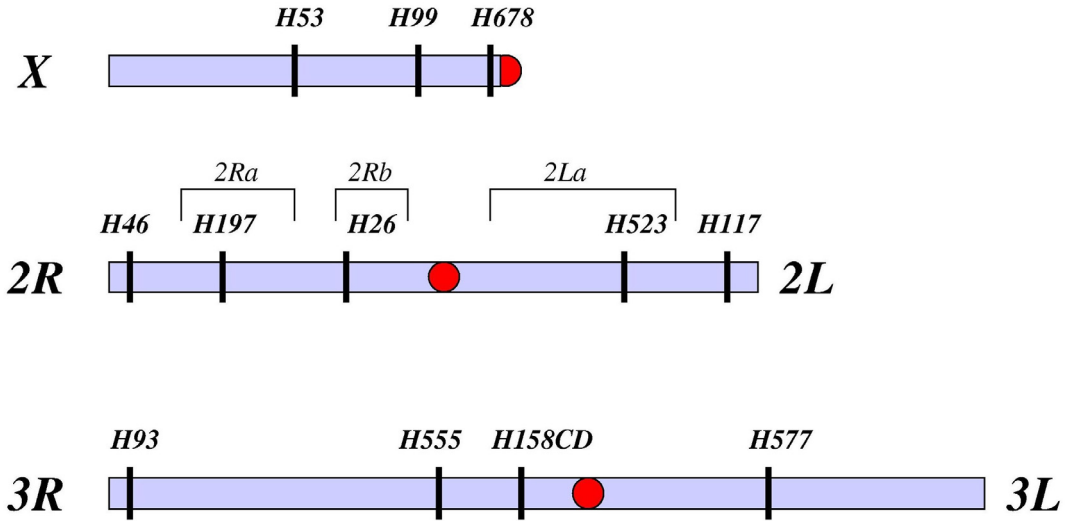


Figure 17. Schéma des chromosomes d'*An. gambiae* s.l. indiquant la position des marqueurs microsatellites sélectionnés pour l'étude des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*. Le marqueur XH99 n'a été utilisé que pour *An. gambiae* s.s. Les cercles rouges représentent les centromères. Trois des marqueurs (2H197, 2H26 et 2H523) sélectionnés sur le chromosome 2 sont localisés dans des inversions paracentriques.

L'estimation des effectifs efficaces (N_e) des populations échantillonnées est présentée en résultats complémentaires. La méthode utilisée (WAPLES 1989) postule que plus l'effectif d'une population est réduit, plus les fréquences alléliques sont susceptibles de varier au fil des générations. Ces fréquences ont été utilisées dans le calcul de F_K (POLLAK 1983), variance standardisée des modifications des fréquences alléliques entre deux moments distincts, pour chaque marqueur microsatellite :

$$Fk = \frac{1}{K-1} \sum \frac{(x_i - y_i)^2}{(x_i + y_i)/2}$$

avec K = nombre d'allèles

x_i et y_i = fréquence de l'allèle i aux générations 0 et t, respectivement

Le F_K pour plusieurs marqueurs (F_{Kall}) est obtenu par la moyenne pondérée des valeurs par locus individuel, avec j marqueurs :

$$Fk_{all} = \sum (K_j - 1)\, Fk_j \;/\; \sum (K_j - 1)$$

Le N_e est estimé à partir de F_K (ou F_{Kall}) :

$$N_e = \frac{t}{2\left(F_K - \frac{1}{2S_0} - \frac{1}{2S_t}\right)}$$

avec S_0 et S_t = taille des échantillons (nombre d'individus) aux générations 0 et t, respectivement

t = nombre de générations entre les deux évènements de capture

Pour chaque marqueur, tous les allèles dont la fréquence était inférieure à 2% aux deux points temporels ont été rassemblés dans une même classe allélique, tel que préconisé afin d'éviter de biaiser les estimations en raison de fréquences alléliques extrêmes (LEHMANN *et al.* 1998; WAPLES 1989). Douze générations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* ont été

supposées entre les deux saisons des pluies successives, de la même manière que dans les précédentes études (LEHMANN *et al.* 1998; SIMARD *et al.* 2000; TAYLOR *et al.* 1993). Enfin, les intervalles de confiance à 95% ont été calculés pour F_K, d'après $(K-1)F_K \ / \ X^2_{(K-1)}$. Cette méthode peut produire des valeurs négatives de N_e, lorsque la variance allélique estimée (F) est inférieure à celle attendue basée sur l'échantillonnage. Ce type de résultat est fréquent pour des grandes populations (WAPLES 1989), et peut être assimilé à un effectif infini.

Chapitre 2. Distribution, comportement et infection des vecteurs

I. Description de la faune anophélienne

Au cours des différentes collectes effectuées entre août 2005 et décembre 2007 dans les douze villages, 38277 anophèles femelles ont été échantillonnés, identifiés et répertoriés. Toutes méthodes de capture confondues, les cinq espèces les plus représentées dans ces échantillons ont été par ordre décroissant *An. gambiae* s.l. (66,3%), *An. hervyi* (23,3%), *An. funestus* (6,5%), *An. pharoensis* (2,0%) et *An. rufipes* (1,5%). *An. gambiae* s.l. a été la principale espèce anophélienne collectée dans tous les villages, ayant représenté entre 74,5% et 99,9% des collectes par village, excepté à Guidimouni où l'espèce a représenté uniquement 3,3% des captures. *An. pharoensis* et *An. rufipes* ont été collectés en petit nombre dans la plupart des villages (présence dans 10 villages sur 12 pour *An. pharoensis*, la totalité pour *An. rufipes*), et ne présentent a priori pas de rôle vecteur au Niger. Quelques rares spécimens d'*An. ziemanni, An. squamosus* et *An. nili* ont également été trouvés. Le village de Guidimouni a présenté une faune anophélienne atypique, dont *An. hervyi*, espèce uniquement collectée dans cette localité, qui ne semble pas participer à la transmission de *P. falciparum* (Annexe 5) (LABBO *et al.* 2010), ayant constitué 74,2% des captures. Il a également été le seul des douze villages où *An. funestus* a été trouvé (à l'exception de six femelles collectées à Firgoune, dans la vallée du fleuve Niger). Concernant Banizoumbou et Zindarou, *An. gambiae* s.l. a également été la principale espèce anophélienne collectée, en

sympatrie avec *An. funestus* à Zindarou uniquement, où cette dernière a constitué 35% des spécimens collectés.

Les proportions de femelles capturées par les différentes méthodes utilisées renseignent sur leurs comportements de piqûre et de repos. Pour les échantillons d'*An. gambiae* s.l., *An. funestus* et *An. pharoensis*, la proportion de spécimens capturés à l'atterrissage a été élevée (59,5% pour *An. gambiae* s.l., 62,6% pour *An. funestus* et 75,9% pour *An. pharoensis*), témoignant de leur anthropophilie prononcée (Figure 18). En revanche le rendement de capture à l'atterrissage d'*An. hervyi*, *An. rufipes* et *An. ziemanni* s'est avéré très faible, ces espèces ayant été principalement collectées à l'aide des pièges lumineux, ainsi que par pyréthrage pour *An. rufipes*, venant conforter l'hypothèse d'espèces ne participant pas ou peu à la transmission palustre.

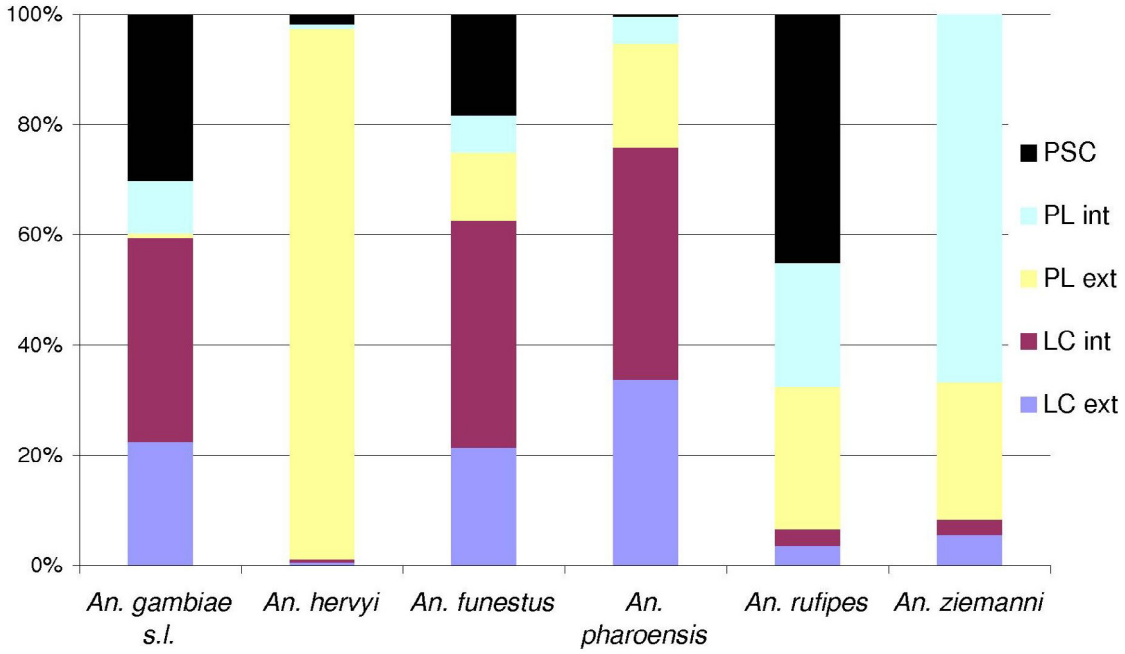


Figure 18. Proportions relatives de femelles des principales espèces collectées par les différentes méthodes, dans les douze sites suivis et toutes périodes confondues. PSC: pyrethrum spray catch (aspersion de pyréthrinoïdes). PL: pièges lumineux. LC: landing catch (capture à l'atterrissage). int: interne. ext: externe.

II. Caractérisation des populations d'*An. gambiae* s.l.

II.1. Abondances et comportements d'*An. gambiae* s.l.

II.1.1. Abondances

Les abondances d'*An. gambiae* s.l. observées ont été très hétérogènes le long du transect (Figure 19). Elles ont été globalement supérieures dans les six sites situés à l'ouest et au centre-est du transect, par rapport aux six villages situés à l'est, au delà de 7°E environ, ce quelque soit la méthode de capture considérée.

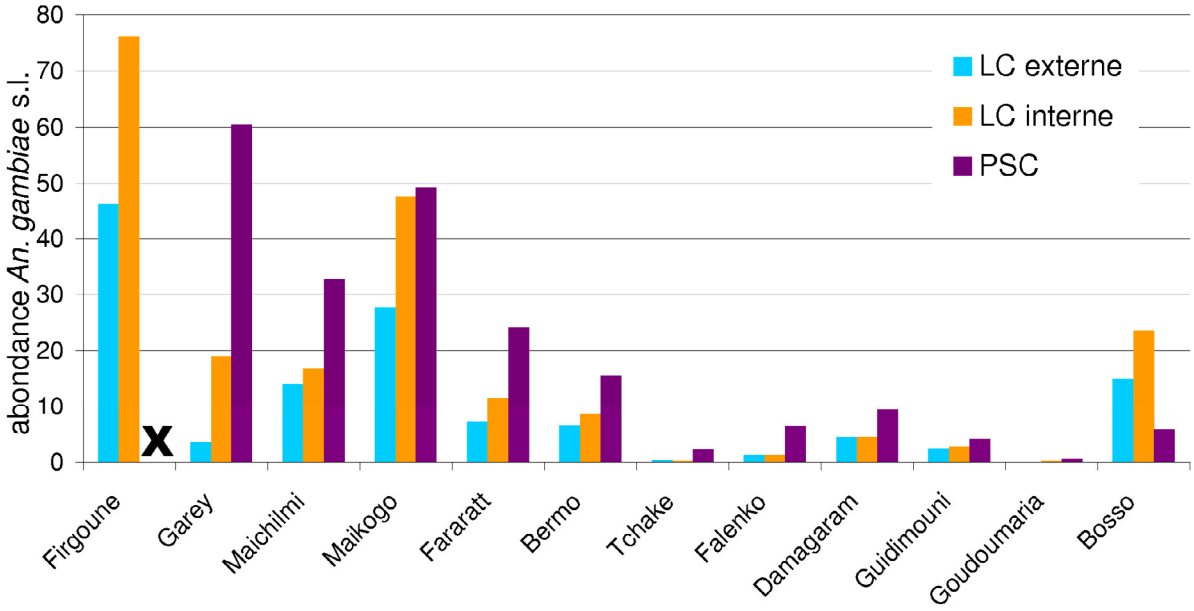


Figure 19. Moyenne du nombre de femelles *An. gambiae* s.l. collectées dans les douze villages, toutes périodes et années confondues, par méthode de capture. Les abondances en ordonnée indiquent le nombre de piqûres par homme/nuit pour les capture à l'atterrissage (LC, *Landing Catch*), et le nombre d'individus au repos par maison collectés par aspersion de pyréthrinoïdes (PSC, *pyrethrum spray catch*). Les sites en abscisse sont présentés d'après leur position longitudinale relative. La croix noire indique l'absence de données.

Les abondances observées ont également été très variables selon les périodes de collecte (Figure 20). Globalement, la dynamique saisonnière des populations d'*An. gambiae* s.l. est apparue très marquée, avec des populations importantes durant la saison des pluies, et bien plus réduites durant la longue saison sèche, voir inaccessibles à l'échantillonnage pratiqué. Aucun spécimen n'a en effet été collecté dans sept villages sur les douze échantillonnés durant la saison sèche 2005-2006. Les collectes effectuées durant les saisons des pluies, entre les mois de juillet et d'octobre, ont représenté 85,9% du total des femelles *An. gambiae* s.l. capturées durant l'ensemble du suivi. On peut tout de même noter le cas de Firgoune, où les populations ont semblé se maintenir plus longtemps après l'arrêt des pluies, probablement grâce à la persistance de gîtes larvaires liés à la proximité du fleuve Niger.

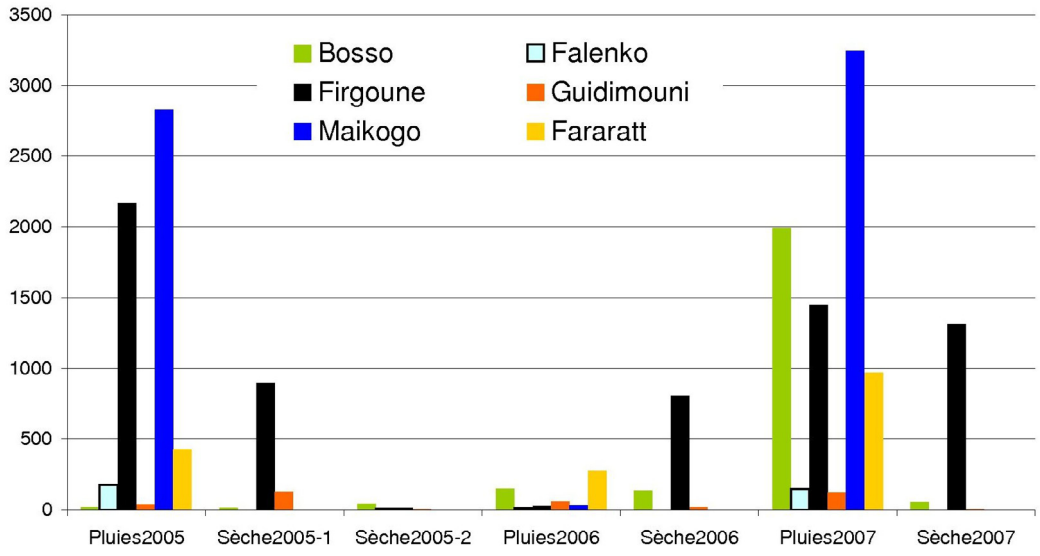


Figure 20. Variations temporelles de l'abondance d'*An. gambiae* s.l. toutes méthodes de capture confondues (sommes) dans les six villages suivis pendant trois ans. La deuxième période de collecte ("Sèche2005-1") correspond à la saison sèche-froide, la troisème période ("Sèche 2005-2") à la saison sèche-chaude.

Les variations d'abondances observées à Zindarou (Figure 21) et Banizoumbou (Figure 22) ont montré une dynamique temporelle similaire, caractérisée par un pic d'abondance important durant les quelques mois de mousson. Cependant les abondances d'*An. gambiae* s.l. ont été largement supérieures à Zindarou, ce quelque soit la saison. La résolution temporelle du suivi a permis de préciser la période de forte abondance dans ces deux villages, avec des valeurs faibles en juin, un maximum durant le mois d'août, suivi d'une chute rapide mise en évidence par les faibles abondances observées en octobre. Il peut donc être considéré que les abondances maximales se sont maintenues approximativement de juillet à septembre. Ces importantes variations saisonnières nous ont contraint à mener la plupart des analyses sur les échantillons de saison des pluies uniquement, les collectes effectuées durant la longue saison sèche ayant souvent été insuffisantes.

Sur l'ensemble des six sites suivis de 2005 à 2007, et quelque soit la technique d'échantillonnage utilisée, les abondances d'*An. gambiae* s.l. pendant la saison des pluies ont montré une baisse en 2006 et une hausse en 2007, à des niveaux de nouveau comparables à ceux de 2005, à l'exception du site le plus à l'est, Bosso, proche du lac Tchad, qui a montré une progression sur les trois années de suivi (Figure 23). Le suivi longitudinal effectué à Zindarou a également permis de mettre en évidence la baisse des abondances d'*An. gambiae* s.l. lors la saison des pluies 2006 (Figure 21), principalement liée à une diminution des effectifs collectés au repos dans les habitations. Cette tendance interannuelle n'a pas été observée à Banizoumbou, où les abondances ont au contraire fortement augmenté lors de la saison pluvieuse 2006, en comparaison aux années 2005 et 2007 (Figure 22).

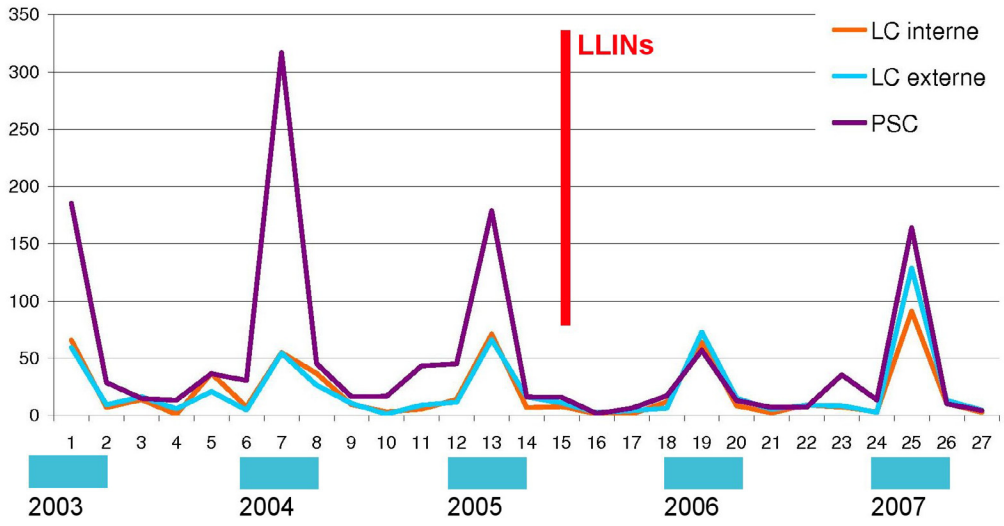


Figure 21. Abondances d'*An. gambiae* s.l. à Zindarou, estimées par les captures à l'atterrissage ainsi que les aspersions intra-domiciliaires de pyréthrinoïdes. En abscisse, les rectangles bleus indiquent la saison des pluies (juin à octobre), l'année est indiquée en dessous. Les abondances en ordonnée indiquent le nombre de piqûres par homme/nuit (LC), et le nombre d'individus au repos par maison (PSC). La barre verticale rouge indique la période de distribution des moustiquaires imprégnées. LC: landing catch. PSC: pyrethrum spray catch. LLINs: Long-Lasting Insecticidal Nets.

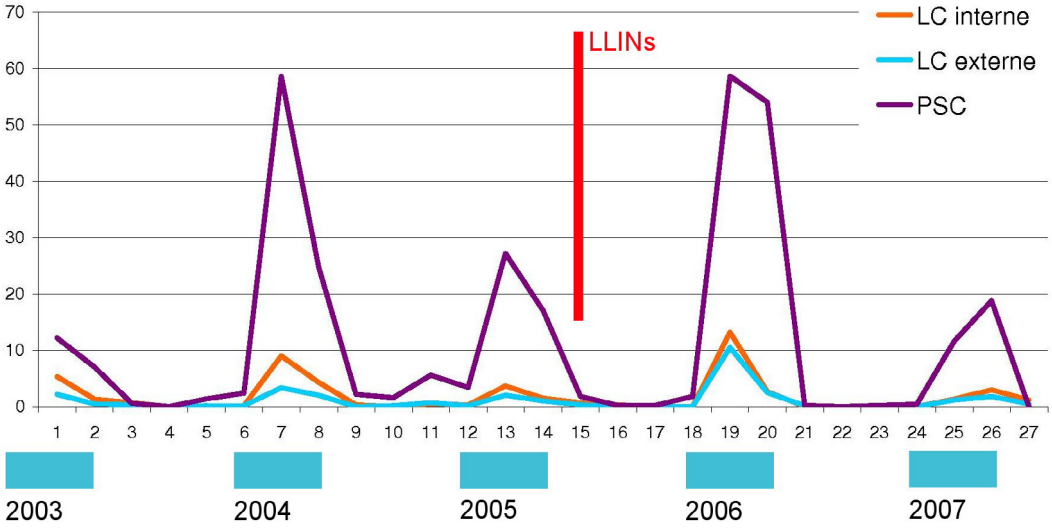


Figure 22. Abondances d'*An. gambiae* s.l. à Banizoumbou, estimées par les captures à l'atterrissage ainsi que les aspersions intra-domiciliaires de pyréthrinoïdes.

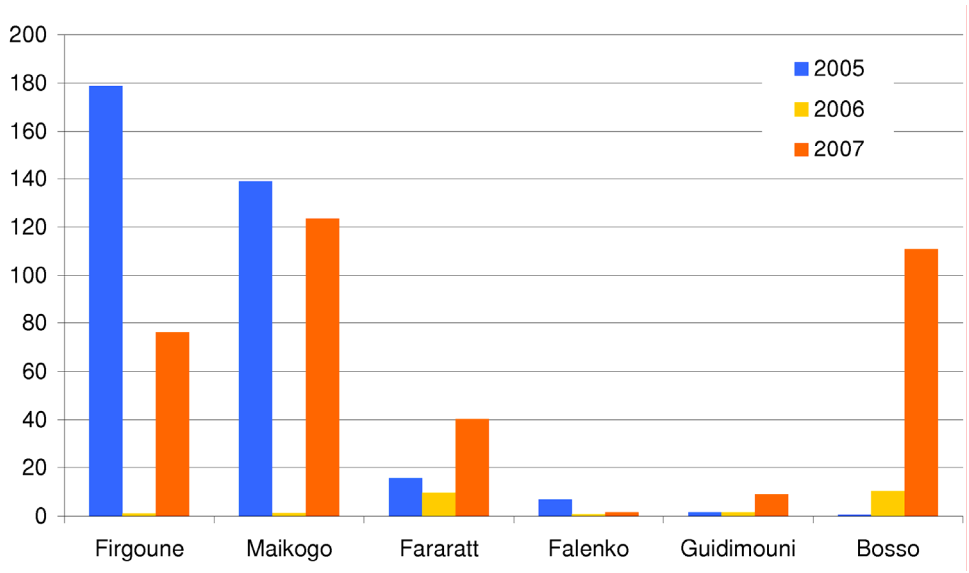


Figure 23. Abondance d'*An. gambiae* s.l. capturé sur homme au cours des trois saisons pluvieuses. Les données représentées constituent la moyenne des captures à l'atterrissage effectuées à l'intérieur et à l'extérieur, estimant le nombre de piqûres reçues par homme et par nuit. Les sites en abscisse sont présentés d'après leur position longitudinale relative.

II.1.2. Estimation de l'endophagie et de l'endophilie des échantillons

Le taux d'endophagie a légèrement augmenté dans la plupart des villages entre 2005 et 2006 (Figure 24A), mais seule la hausse mesurée à Fararatt est significative (X^2 bilatéral; p=0,0446). Plusieurs valeurs sont probablement peu représentatives étant donné les petits effectifs collectés durant certaines missions, notamment à Guidimouni (n=19 en 2005; 19 en 2006) et Falenko (n=9 en 2006; 19 en 2007). Les taux d'endophagie observés en 2007 à Firgoune, Maikogo et Fararatt ont été très proches des valeurs de 2005, en revanche il a augmenté de manière significative à Bosso (X^2 bilatéral; p=0,0399). En regroupant les sites par zone géographique (Firgoune, Maikogo et Fararatt à L'ouest / Falenko, Guidimouni et Bosso à l'Est), la hausse du taux d'endophagie entre 2005 (0,601) et 2006 (0,720) dans les sites de la zone ouest est significative (X^2 bilatéral; p=0,0055), tout comme la baisse entre 2006 et 2007 (p=0,0075). A l'est en revanche, le taux a peu varié entre 2005 (0,477) et 2006 (0,527) (p=0,5065) et a augmenté de 2006 à 2007 (0,619) (p=0,0347), principalement du fait de la hausse observée à Bosso. De plus, en 2005 et 2006, le taux d'endophagie mesuré

dans la zone ouest à été significativement plus élevé que dans la zone est (p=0,0125 et 0,0009, respectivement). A banizoumbou, le taux d'endophagie moyen sur les saisons pluvieuses 2003-2007 (0,630) a été plus élevé qu'à Zindarou (0,470) (X^2 bilatéral; p<0,00001) (Figure 25). De plus, les échantillons de saison pluvieuse ont montré une baisse du taux d'endophagie concomitante à la mise en place des LLINs dans les deux villages (Banizoumbou 0,697vs0,561; Zindarou 0,503vs0,427; X^2 bilatéral p<0,00001).

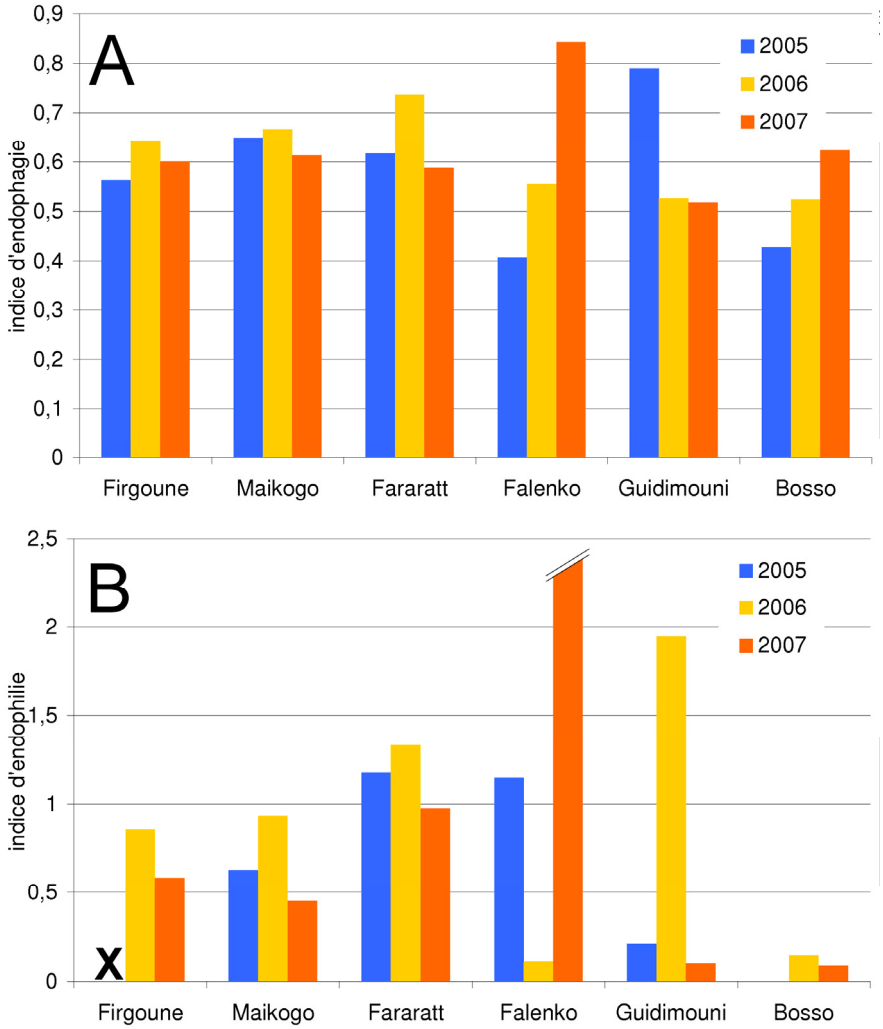


Figure 24. Taux d'endophagie (A) et indice d'endophilie (B) d'*An. gambiae* s.l. estimés dans les six sites durant la saison des pluies. L'indice d'endophilie représenté est le rapport du nombre de femelles au repos collectées dans les habitations sur le nombre de femelles capturées sur homme, à l'intérieur et à l'extérieur. La croix indique l'absence de données à Firgoune en 2005.

Les variations temporelles de l'indice d'endophilie utilisé ont été hétérogènes selon les villages (Figure 24B). La tendance endophile des femelles collectées a semblé suivre les variations temporelles du taux d'endophagie dans les villages de la zone ouest. L'indice d'endophilie a été particulièrement bas à Bosso, alors que le taux d'endophagie moyen mesuré y a atteint 61,4%. La valeur extrême observée à Falenko en 2007 (6,84) est due à la collecte de 19 femelles *An. gambiae* sur homme contre 130 au repos à l'intérieur. Toutefois, lorsque les sites sont regroupés par zones (et sans prendre Firgoune en compte en raison de l'absence de capture de la faune résiduelle en 2005), la comparaison des échantillons de 2005 et 2007, années climatiquement proches, a montré une chute significative de l'indice d'endophilie, tant dans la zone ouest (0,683 en 2005; 0,579 en 2007; X^2 p=0,00168) que la zone est (0,907 en 2005; 0,177 en 2007; X^2 p<0,00001). De plus, le taux d'endophilie toutes années confondues estimé dans les sites de la zone ouest a été plus élevé que dans la zone est (respectivement 0,422 et 0,240; X^2 p<0,00001). Le suivi longitudinal effectué à Zindarou a également montré une tendance nette à la baisse de l'endophilie en 2006 et 2007 (indice moyen de 1,02 en 2003-2005 contre 0,51 en 2006-2007; X^2 p<0,00001) (Figure 26), tandis que l'indice d'endophilie à Banizoumbou était plus élevé et relativement stable durant les saisons des pluies 2003-2007 (moyenne de 3,34 femelles capturées au repos par femelle capturée à l'atterrissage).

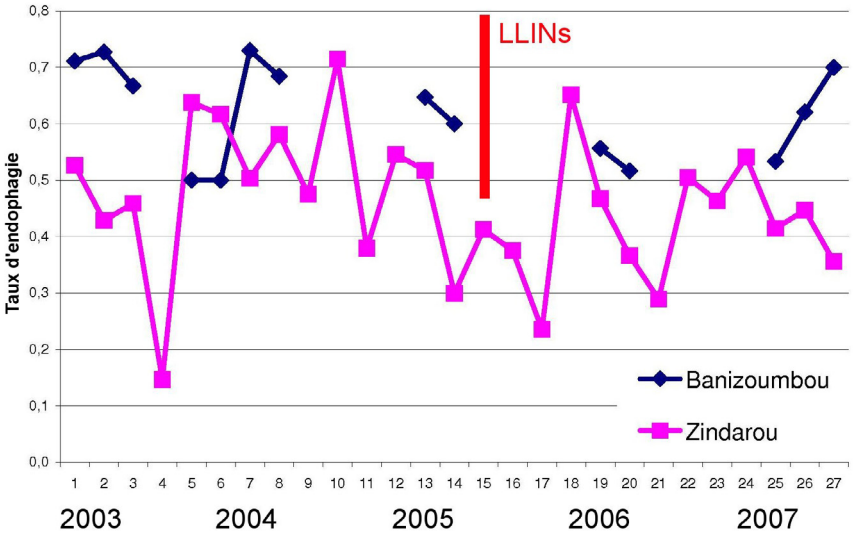


Figure 25. Taux d'endophagie d'*An. gambiae* s.l. estimé à Banizoumbou et Zindarou.

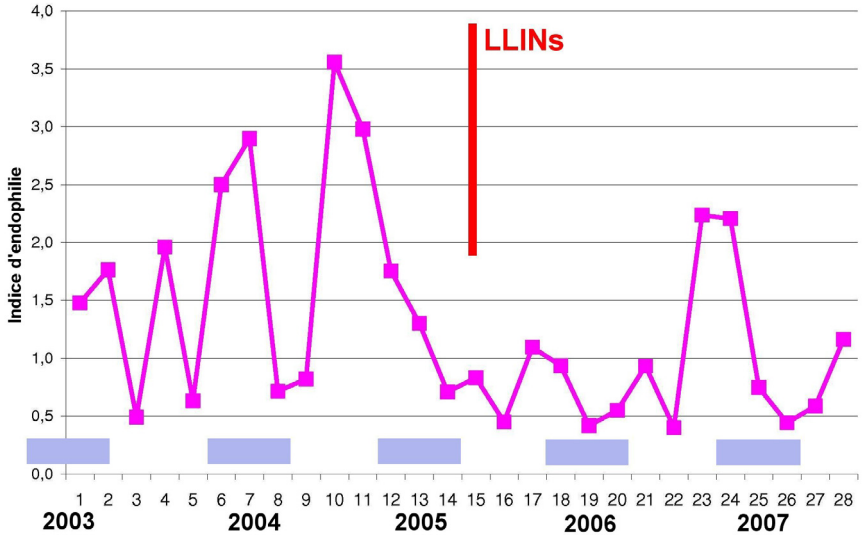


Figure 26. Indice d'endophilie d'*An. gambiae* s.l. en saison des pluies à Zindarou. En abscisse, les rectangles bleus indiquent la saison des pluies, l'année est indiquée en dessous.

II.1.3. Taux de parturité

Le taux de parturité des échantillons d'*An. gambiae* s.l. collectés pendant la saison des pluies est présenté pour les mêmes six sites (Figure 27). Chaque site analysé individuellement, seules la baisse du taux de parturité à Fararatt en 2006 (X^2 bilatéral; p=0,00903) et les hausse à Guidimouni et Bosso en 2007 (p=0,00036 et 0,03900, respectivement) ont été significatives. L'analyse des deux groupes géographiques a montré une certaine stabilité du taux de parturité à l'ouest (65% en 2005, 51% en 2006, 61% en 2007, variation non significative), et une hausse à l'est en 2007 (63% en 2006, 94% en 2007, p<0,00001). A Zindarou, le suivi mené d'août 2003 à août 2007 a montré une baisse significative du taux de parturité moyen entre les saisons des pluies 2003-2005 et les saisons 2006-2007 (X^2 bilatéral; p=0,00294), de même qu'entre les saisons sèches (p=0,01669) (Figure 28). Enfin, alors que la variation est significative sur l'ensemble des saisons pluvieuses (X^2 bilatéral; ddl=4; p=0,00476), l'analyse d'une année sur l'autre a montré des variations non significatives hormis la baisse observée entre 2005 et 2006 (X^2 bilatéral; p=0,00349).

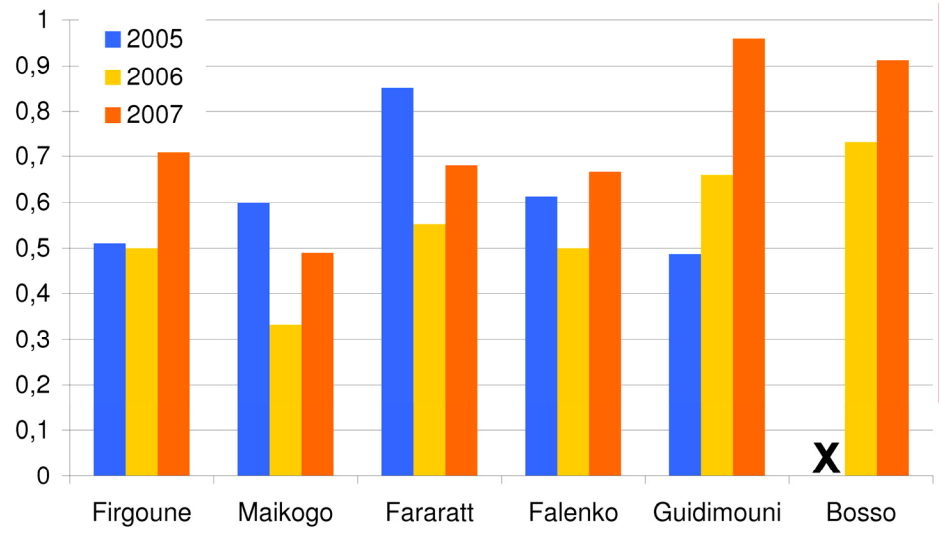


Figure 27. Taux de parturité d'*An. gambiae* s.l. pendant les saisons des pluies 2005 à 2007. La croix indique une absence de données.

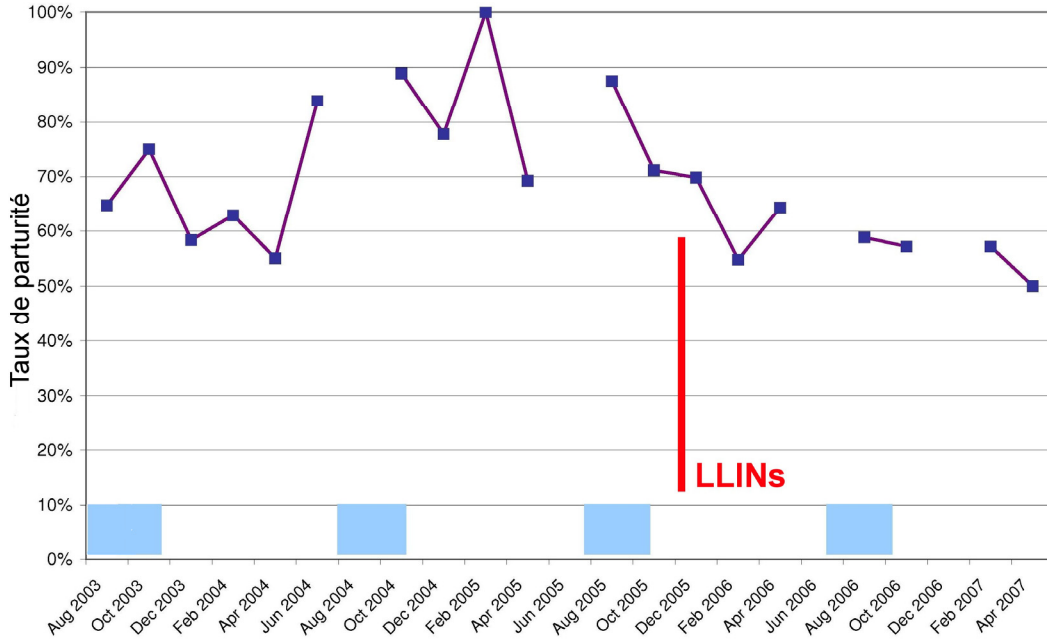


Figure 28. Variations du taux de parturité d'*An. gambiae* s.l. à Zindarou entre 2003 et 2007.

II.2. Distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

Il est primordial de déterminer la composition spécifique des populations identifiées morphologiquement comme appartenant au complexe *An. gambiae*, celle-ci ayant de nombreuses implications en terme de transmission du paludisme et dans la définition des méthodes de lutte antivectorielle. Les deux formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. ainsi qu'*An. arabiensis* ont été identifiés dans les échantillons du transect collectés durant les saisons des pluies. Cependant, alors qu'*An. gambiae* M et *An. arabiensis* ont été retrouvés en sympatrie dans la majorité des villages, témoignant de leur large distribution, la forme moléculaire S a été retrouvée en très faible proportion dans quelques sites de la zone ouest du pays (Garey, Banizoumbou, Zindarou, Maikogo et Fararatt), ayant représenté uniquement 1,1% de l'ensemble des spécimens déterminés (24 spécimens sur 2147). De plus, la proportion relative d'*An. gambiae* S dans l'échantillon total était significativement plus élevée en 2005 (1,6%) comparée à 2006 (0,4%) (X^2 2005vs2006, p=0,02832), principalement lié à la contribution de Banizoumbou.

La proportion relative d'*An. gambiae* M et d'*An. arabiensis* est apparue liée à la longitude, avec une grande majorité d'*An. gambiae* M vers l'ouest du pays, remplacé progressivement par *An. arabiensis* vers l'est, jusqu'à être la seule espèce trouvée à proximité du lac Tchad, dans le village de Bosso (Figure 29). En plus de cette répartition géographique contrastée des espèces et formes du complexe, des variations ont été observées entre les différentes saisons des pluies. En considérant l'ensemble des échantillons tous sites confondus, une baisse significative du pourcentage d'*An. gambiae* a été observée, de 66,3% en 2005 à 41,4% en 2006 (X^2 2005vs2006, p<0,00001), pourcentage resté similaire en 2007 (43,1%) (X^2 2006vs2007, p=0,6052). En analysant chaque village séparément, des variations significatives ont été observées à Banizoumbou, Zindarou, Fararatt et Guidimouni. A Banizoumbou, la proportion d'*An. gambiae* a fortement chuté en 2006 (47,4%) par rapport à 2005 (71,1%) (X^2 2005vs2006, p=0,00052), puis est

remontée en 2007 à 71,7% (X^2 2006vs2007, p=0,00722), valeur très proche de celle de 2005. A Zindarou, la proportion d'*An. gambiae* a en revanche augmenté de 37,3% en 2005 à 60,0% en 2006 (X^2 2005vs2006, p=0,00021), et s'est maintenue en 2007 (63,8%) (X^2 2006vs2007, p=0,6395). A Fararatt, une baisse importante et continue de la proportion d'*An. gambiae* à été observée de 72,6% en 2005 à 49,5% en 2006 (X^2 2005vs2006, p=0,00048) et 25,3% en 2007 (X^2 2006vs2007, p=0,00159). La baisse de proportion d'*An. gambiae* observée à Guidimouni entre 2005 et 2006 a également été significative (X^2 2005vs2006, p=0,02638), malgré un faible effectif testé en 2005 (n=7).

Il est à noter qu'aucun spécimen hybride *An. gambiae-An. arabiensis* n'a été identifié, bien que ces deux espèces soient largement sympatriques dans la zone étudiée. L'absence d'hybrides entre formes moléculaires M et S a aussi été observée, mais n'est pas réellement informative en raison du déséquilibre d'abondance très important entre formes, tout en ne permettant pas d'exclure l'occurrence de croisements entre formes moléculaires à faible fréquence dans les rares zones de sympatrie.

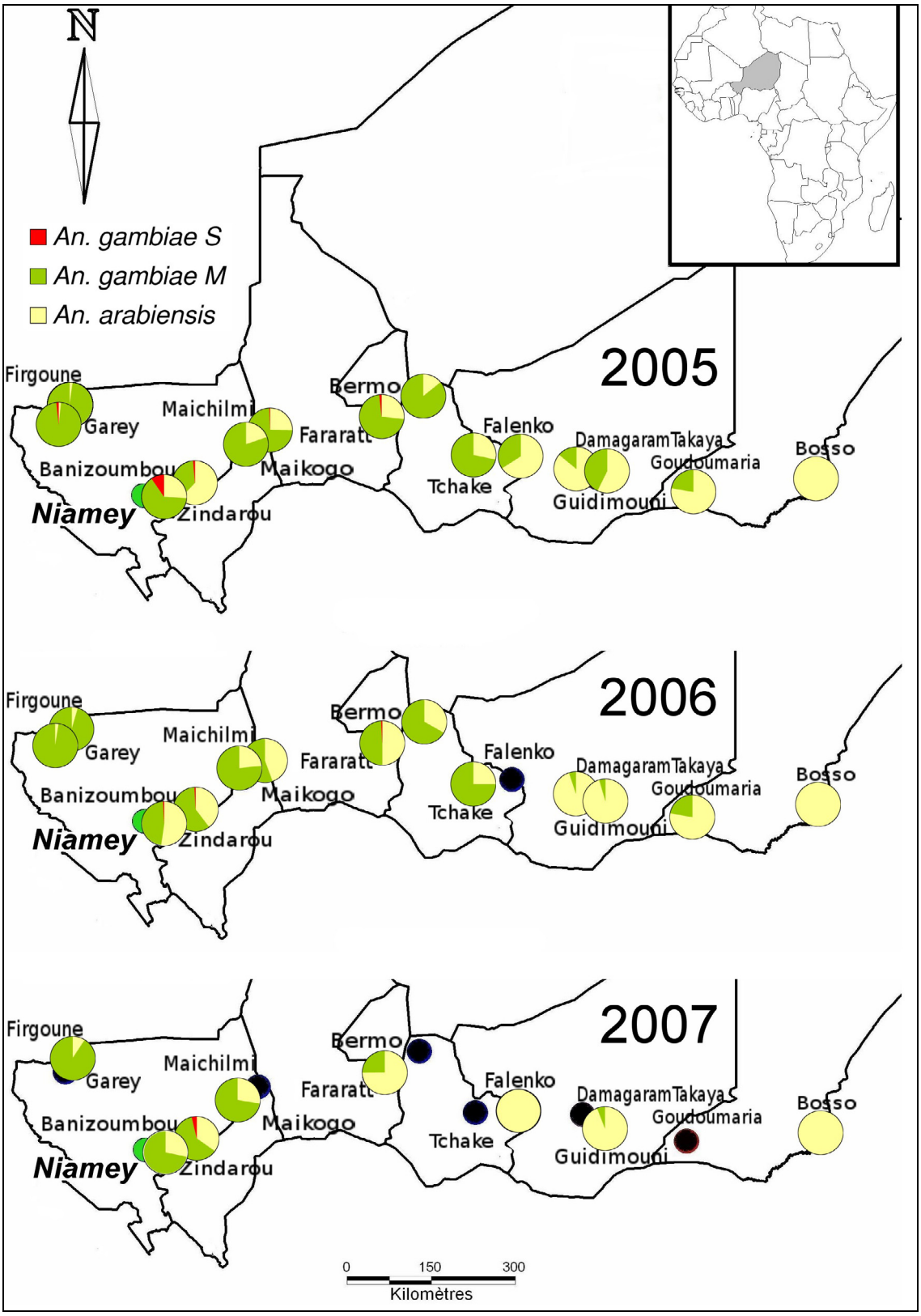


Figure 29. Répartition des espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae* pendant les saisons des pluies 2005 à 2007. Les cercles colorés indiquent les proportions relatives d'*An. gambiae* M (vert), *An. arabiensis* (beige) et *An. gambiae* S (rouge). Les cercles noirs indiquent l'absence de données.

Dans quatre sites (Banizoumbou, Zindarou, Maikogo et Fararatt) où les deux espèces sont sympatriques, des sous-échantillons ont été distingués selon la méthode de capture employée (Figure 30). Des différences dans les proportions relatives d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* ont été observées entre les collectes des femelles au repos et à la recherche d'un repas sanguin, dont trois valeurs significatives (en 2006 à Banizoumbou, en 2005 et 2007 à Zindarou) montrant un fréquence plus importante d'*An. arabiensis* au repos à l'intérieur des habitations. A Fararatt, où la proportion d'*An. gambiae* à chuté au profit d'*An. arabiensis* de 2005 à 2007, les valeurs observées ont été très proches entre méthodes de capture.

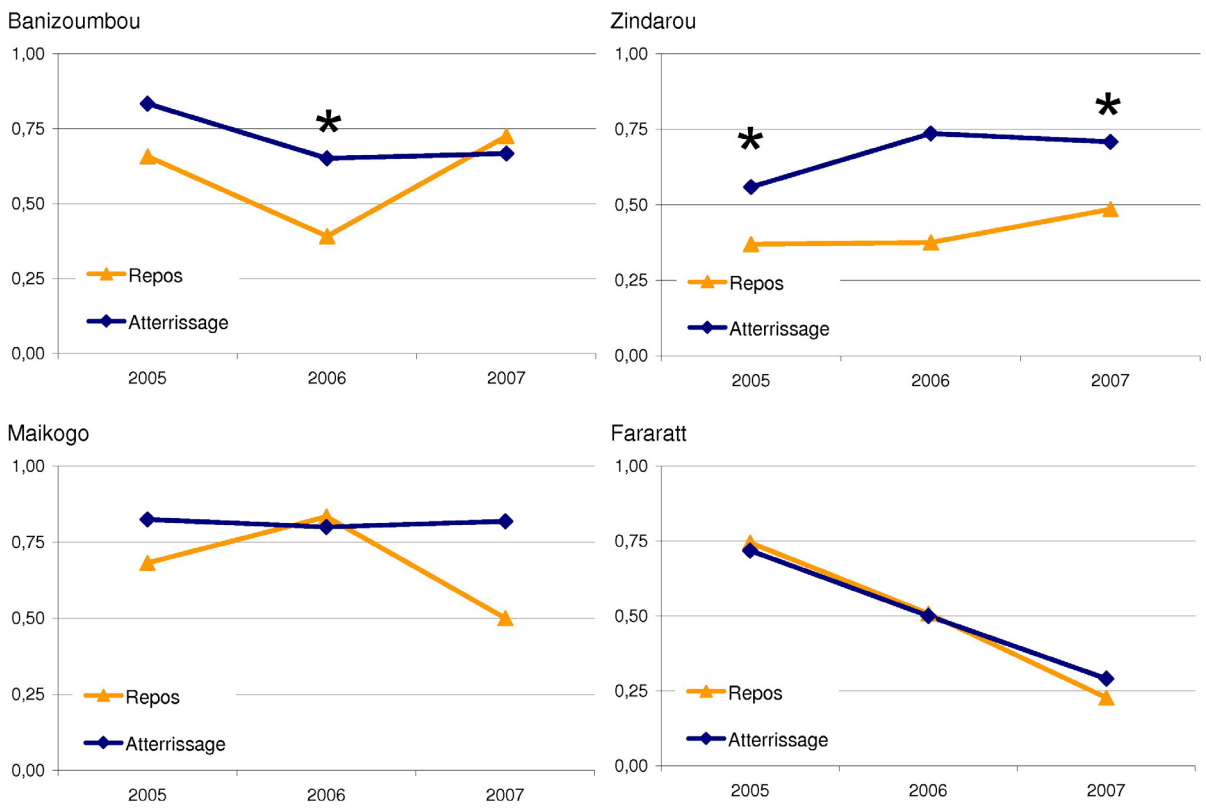


Figure 30. Proportion relative d'*An. gambiae* M dans les échantillons d'*An. gambiae* s.l. selon la méthode de capture utilisée (faune résiduelle en orange, faune agressive en bleu), au cours des trois saisons des pluies étudiées dans quatre villages. Les ordonnées représentent la fréquence des individus An. gambiae M dans les échantillons. Les étoiles indiquent les différences significatives entre méthodes de capture.

Les abondances d'*An. gambiae* M et *An. arabiensis* ont été estimées en combinant leurs proportions relatives avec les abondances d'*An. gambiae* s.l. collectées à l'atterrissage. On remarque à nouveau les plus grandes abondances au niveau de la moitié ouest du pays (Figure 31), constituées en grande partie d'*An. gambiae* M, en comparaison de la zone est où les abondances sont nettement inférieures et où *An. arabiensis* est le vecteur majeur.

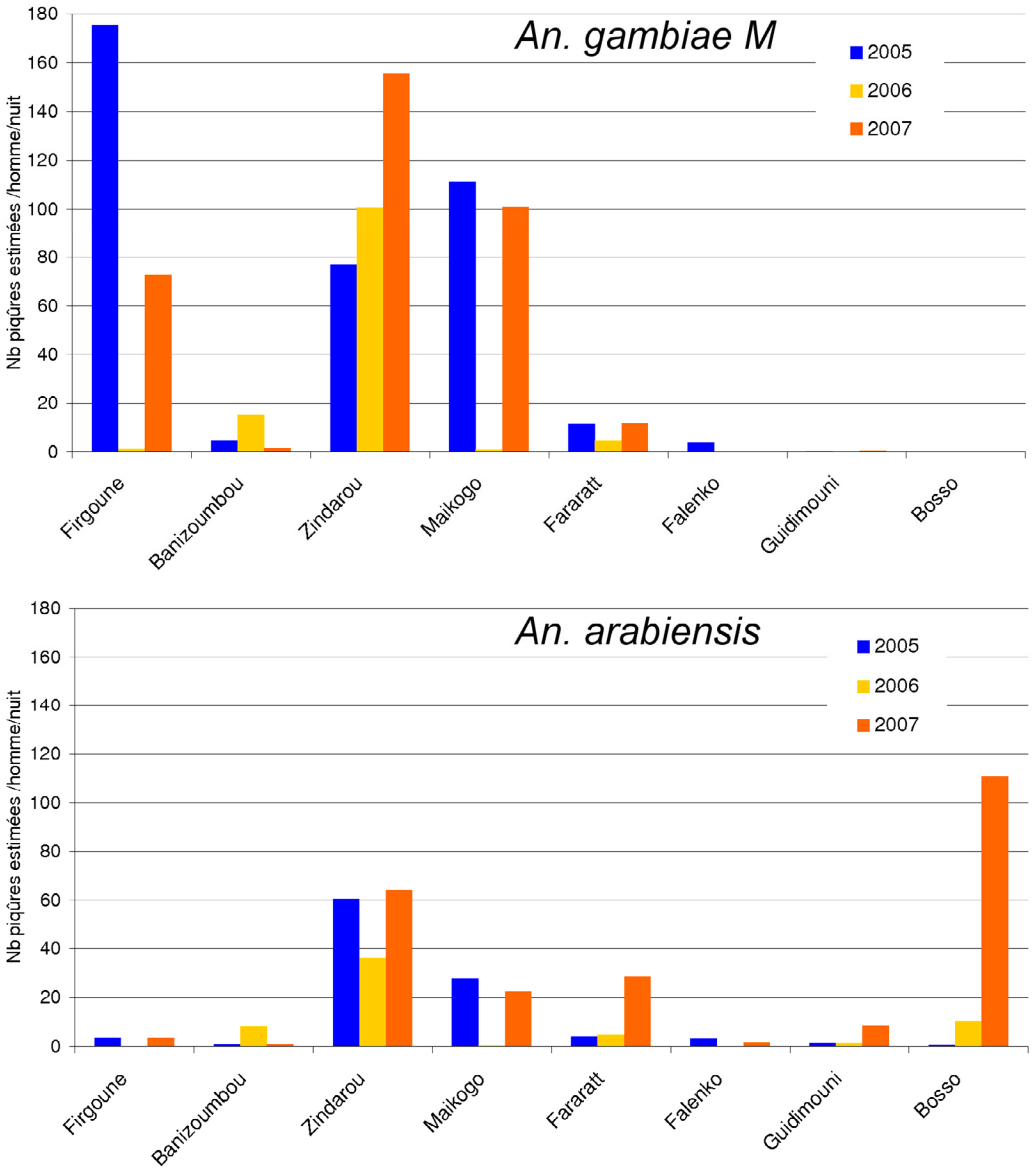


Figure 31. Estimation des abondances d'*An. gambiae* M et *An. arabiensis* dans les huit sites suivis de 2005 à 2007. Les ordonnées indiquent le nombre moyen de femelles capturées à l'atterrissage par maison au cours d'une nuit, durant les saisons des pluies 2005-2007. Les sites en abscisse sont présentés d'après leur position longitudinale relative.

La diminution globale des abondances en 2006, suivie en 2007 d'un retour à des valeurs comparables à 2005, a également été mise en évidence. Cependant des contrastes d'abondance importants sont observés y compris entre sites proches, tels que Banizoumbou et Zindarou. Malgré le moindre nombre de villages visités en 2007 (8/14), le profil général d'abondance le long du transect a semblé se rapprocher des observations de 2005, à l'exception de hausses d'abondance d'*An. arabiensis* dans plusieurs sites de la zone est, dont Bosso, à l'extrémité orientale du pays, où la population d'*An. arabiensis* a explosé.

Le polymorphisme de l'inversion 2La a été étudié par PCR dans un sous-échantillon d'*An. gambiae* M provenant de Firgoune et Garey. Tous les spécimens ont présenté le génotype 2La/2La, correspondant à une fréquence maximum de l'arrangement standard $2L^+$ de 5,7% (Intervalle de confiance à 95% avec n=63).

III. Infection des vecteurs

III.1. Infection d'*An. gambiae* s.l.

Le taux d'infection global des échantillons d'*An. gambiae* s.l. collectés pendant la saison de transmission a été estimé à 2,73% en 2005, 1,09% en 2006, et 0,78% en 2007 (Tableau 1). La diminution observée est statistiquement significative sur toute la période (X^2 bilatéral; ddl=2; p=0,00036) comme pour la comparaison avant/après distribution des LLINs (X^2 bilatéral; ddl=1; p=0,00013), suggérant une réduction globale du niveau de transmission de *P. falciparum* dans la zone sahélienne. L'analyse des six sites suivis pendant trois ans a donné des résultats très similaires. Les faibles effectifs collectés dans plusieurs villages, principalement en 2006, n'ont pas permis d'estimer la prévalence des femelles infectées avec précision et ont compliqué l'analyse de ses variations interannuelles. A l'échelle du village, seule la baisse du taux d'infection observée à Falenko suite à la distribution de moustiquaires a été significative (Test exact de Fisher; p=0,0289).

Concernant les deux sites suivis longitudinalement, le taux d'infection *d'An. gambiae* s.l. durant la saison des pluies (collectes d'août et octobre confondues) a également baissé suite à l'opération à Zindarou (X^2 bilatéral; ddl=1; p=0,03082) mais n'a pas varié à Banizoumbou (X^2 bilatéral; ddl=1; p=0,8871) (Figure 32, Tableau 2). De plus, à Zindarou la période à risque d'infection a semblé débuter plus tardivement dans les deux années ayant suivi la distribution des moustiquaires, aucune femelle n'ayant été trouvée infectée en début de saison des pluies, lors des collectes du mois de juin (Figure 33).

	pluies 2005		Pluies 2006		Pluies 2007		Total	
site	n	Taux d'infection	n	Taux d'infection	n	Taux d'infection	n	Taux d'infection
Firgoune	352	1,13 [0,31 - 2,88]	22	4,54 [0,11 - 22,84]	176	0,00 [0,00 - 2,07]	550	0,90 [0,30 - 2,11]
Garey	264	1,52 [0,41 - 3,83]	27	0,00 [0,00 - 12,77]		-	291	1,37 [0,37 - 3,48]
Maichilmi	176	2,84 [0,93 - 6,50]	21	4,76 [0,12 - 23,82]		-	197	3,04 [1,12 - 6,51]
Maikogo	202	0,49 [0,01 - 2,73]	30	3,33 [0,08 - 17,22]	176	0,00 [0,00 - 2,07]	408	0,49 [0,06 - 1,76]
Fararatt	312	3,52 [1,77 - 6,22]	188	1,06 [0,13 - 3,79]	176	2,84 [0,93 - 6,51]	676	2,66 [1,59 - 4,18]
Bermo	264	4,17 [2,10 - 7,33]	7	0,00 [0,00 - 40,96]		-	271	4,06 [2,04 - 7,15]
Tchake	64	4,69 [0,98 - 13,09]	4	0,00 [0,00 - 60,24]		-	68	4,41 [1,13 - 11,54]
Falenko	171	7,01 [3,68 - 11,94]	12	0,00 [0,00 - 26,47]	58	0,00 [0,00 - 6,16]	241	4,97 [2,60 - 8,54]
Damagaram	105	1,90 [0,23 - 6,71]	268	0,74 [0,09 - 2,67]		-	373	1,07 [0,29 - 2,72]
Guidimouni	11	0,00 [0,00 - 28,49]	20	0,00 [0,00 - 16,84]	91	1,09 [0,03 - 5,97]	122	0,81 [0,02 - 4,48]
Goudoumaria	17	0,00 [0,00 - 19,51]	11	0,00 [0,00 - 28,49]		-	28	0,00 [0,00 - 12,34]
Bosso		-	121	0,82 [0,02 - 4,52]	224	0,44 [0,01 - 2,46]	345	0,57 [0,07 - 2,08]
Total	1938	2,73 [2,05 - 3,56]	731	1,09 [0,47 - 2,14]	901	0,78 [0,31 - 1,59]	3570	1,90 [1,48 - 2,41]

Tableau 1. Taux d'infection estimés par ELISA-CSP dans les échantillons d'*An. gambiae* s.l. collectés en 2005 (avant distribution des LLINs), 2006 et 2007 (après distribution). Les taux d'infection, indiqués en pourcentages, sont suivis des intervalles de confiance à 95% entre crochets. n: taille des échantillons.

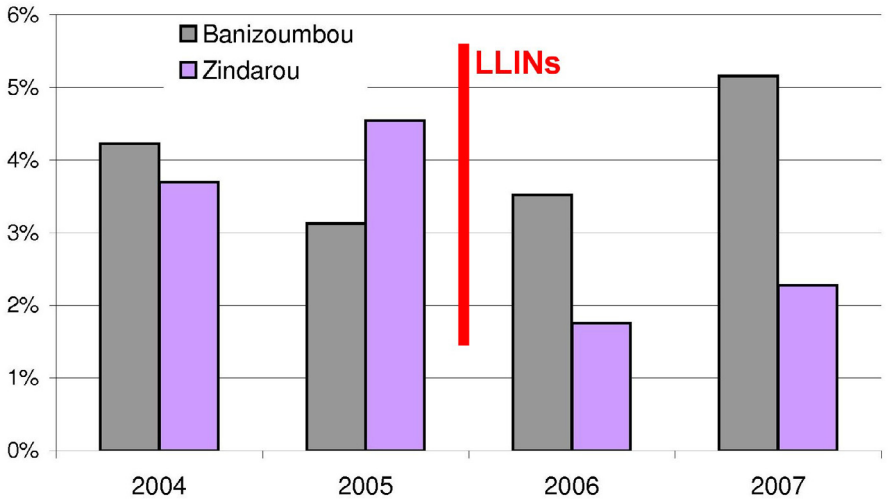


Figure 32. Taux d'infection d'*An. gambiae* s.l. estimé à Banizoumbou et Zindarou pendant les saisons des pluies 2004 à 2007 (échantillons collectés en août et octobre confondus). La barre rouge indique la période de mise en place des moustiquaires du programme.

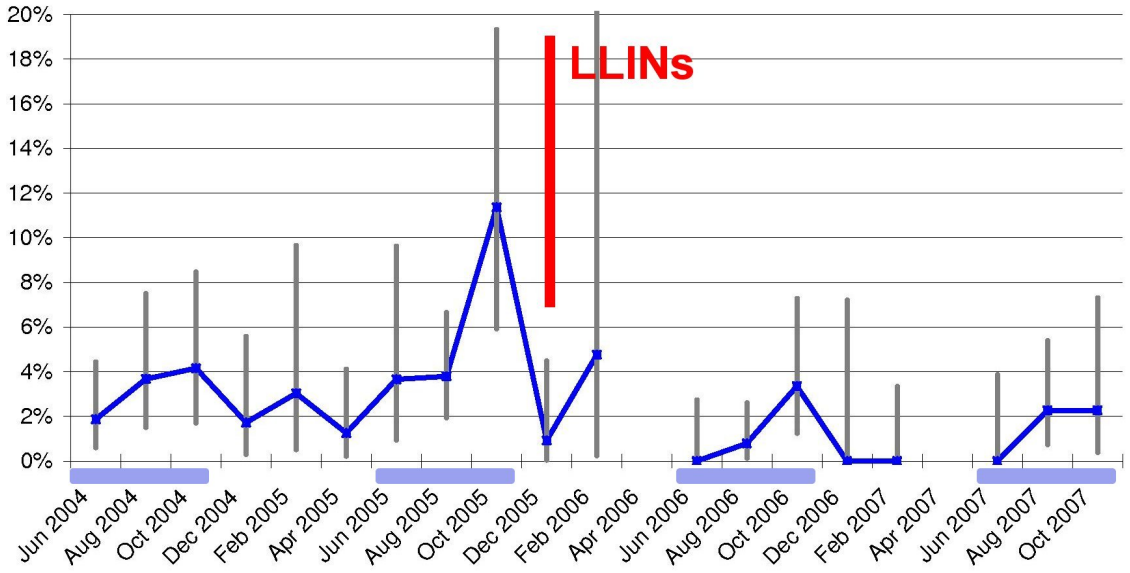


Figure 33. Variations du taux d'infection *d'An. gambiae* s.l. estimé à Zindarou de 2004 à 2007. Les barres verticales grises indiquent les intervalles de confiance à 95%. Les saisons des pluies sont indiquées en abscisse par des rectangles bleus. La barre rouge indique la période de mise en place des moustiquaires du programme.

Avec la chute drastique des abondances observée dans la majorité des sites entre 2005 et 2006, le taux d'inoculation entomologique global (tous sites confondus) a fortement baissé de 1,52 à 0,05 piqûres potentiellement infectantes par homme et par nuit (Pi/h/n). En revanche, de fortes abondances ont été observées en 2007 (valeur globale légèrement supérieure à 2005) ayant fait remonter le taux d'inoculation moyen à 0,47 Pi/h/n. Il convient cependant de noter qu'en 2007, aucune femelle n'a été trouvée infectée dans trois des six sites (Firgoune n=176 ; Maikogo n=176 ; Falanco n=58) tandis que Fararatt et Bosso ont fortement contribué aux taux d'inoculation global trouvé (Figure 34).

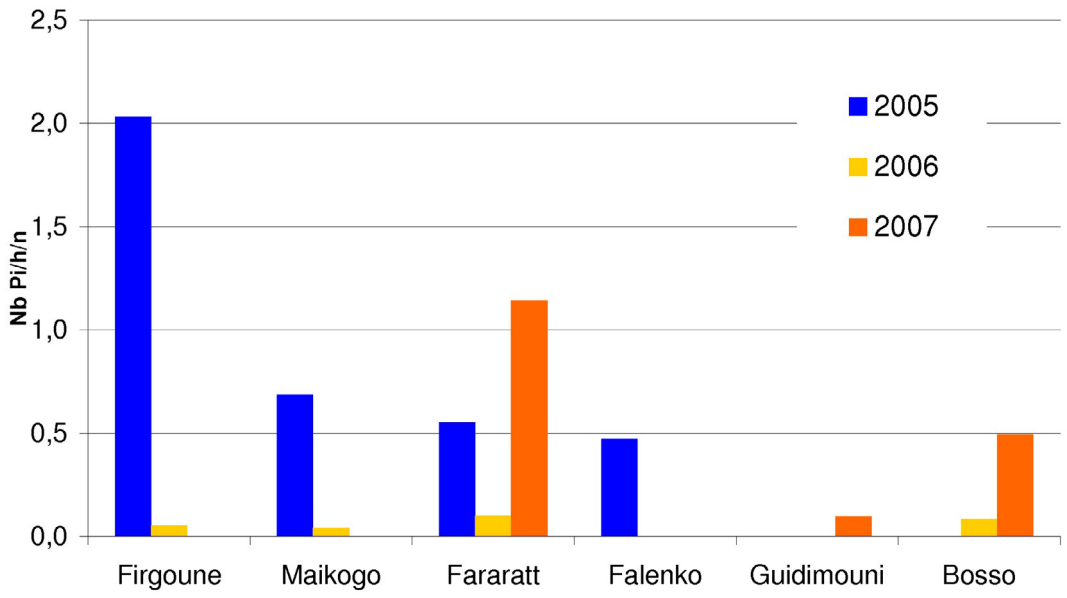


Figure 34. Taux d'inoculation entomologique journalier d'*An. gambiae* s.l. estimé dans six villages sahéliens durant les saisons des pluies 2005-2007. Les sites en abscisse sont présentés d'après leur position longitudinale relative. Nb Pi/h/n: nombre de piqûres potentiellement infectantes par homme et par nuit.

A Zindarou, la baisse des abondances combinée à la diminution significative de l'indice sporozoïtique observées durant la saison des pluies 2006 a conduit à une chute du taux d'inoculation journalier estimé (Figure 35), qui a augmenté à nouveau en 2007. En extrapolant les taux journaliers estimés à Zindarou et en faisant l'hypothèse d'une période de transmission de six mois (juin à novembre), le taux d'inoculation annuel a atteint 307 (IC 95%=125-628) et 303 (IC 95%=147-558) Pi/homme en 2004 et 2005, respectivement, avant de chuter fortement pour atteindre 48 (IC 95%=12-144) Pi/homme en 2006, et 139 (IC 95%=42-349) Pi/homme en 2007. A Banizoumbou, les effectifs plus limités ont rendu difficile l'estimation précise des taux d'infection en dehors de la période de forte abondance, qui ne sont donc pas présentés. Cette période de faible abondance pendant la saison sèche implique des taux d'inoculation très faibles, qui ont été estimés négligeables pour le calcul du taux d'inoculation annuel. Durant la saison de transmission assimilée à la période couvrant les collectes d'août et octobre, le taux d'inoculation entomologique a suivi les abondances

d'*An. gambiae* s.l. (Figure 22) étant donné la relative stabilité de la prévalence des femelles infectées entre les années (Tableau 2), soit des valeurs importantes en 2004 et 2006 (près de 60 piqûres infectantes par homme au cours de la saison de transmission) et plus réduites en 2005 et 2007 (près de 20 Pi/homme).

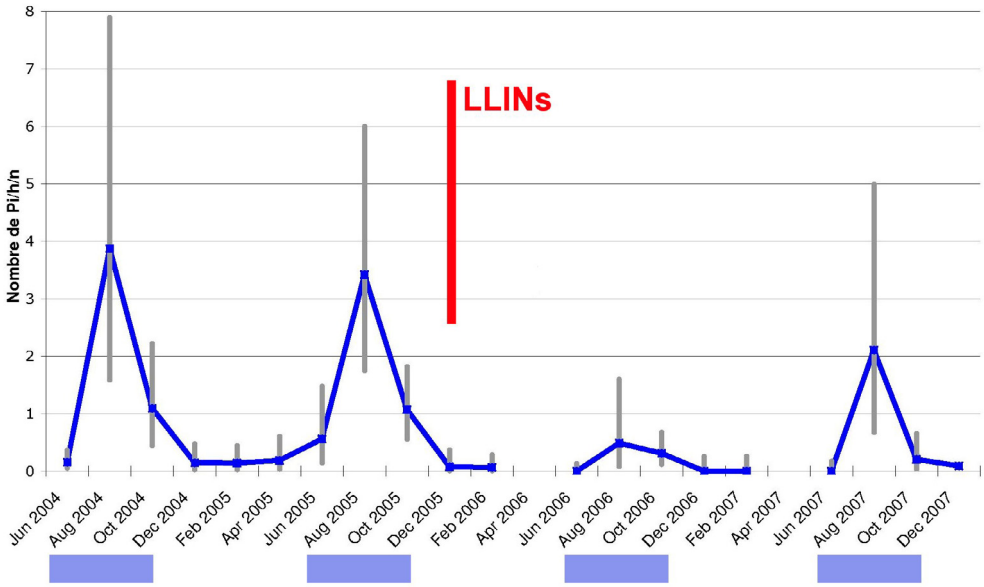


Figure 35. Variations du taux d'inoculation entomologique journalier dû à *An. gambiae* s.l., estimé à Zindarou de 2004 à 2007. Les barres verticales grises indiquent les intervalles de confiance à 95%. Les saisons des pluies sont indiquées en abscisse par des rectangles bleus. La barre rouge indique la période de mise en place des moustiquaires du programme. Pi/h/n: piqûres potentiellement infectantes par homme et par nuit.

année	Indice CSP	EIR journalier	EIR annuel
2004	4,41% [2,3 - 7,6]	0,49 [0,21 - 0,96]	58,6 [25,5 - 115,6]
2005	3,13% [1,4 - 6,3]	0,17 [0,05 - 0,42]	20,7 [6,5 - 50,6]
2006	3,52% [1,9 - 5,9]	0,47 [0,22 - 0,96]	56,7 [25,8 - 115,0]
2007	5,15% [1,7 - 11,6]	0,14 [0,05 - 0,78]	17,3 [6,4 - 93,4]
avant LLINs	3,83% [2,3 - 5,9]	0,33 [0,13 - 0,69]	39,6 [16,0 - 83,1]
Après LLINs	3,86% [2,3 - 6,0]	0,31 [0,13 - 0,87]	37,0 [16,1 - 104,2]

Tableau 2. Indice sporozoïtique (CSP) et taux d'inoculation entomologique (EIR) d'*An. gambiae* s.l. à Banizoumbou durant la saison de transmission, considérée comme la période couvrant les collectes d'août et d'octobre. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre crochets.

III.2. Infection d'*An. funestus*

Deux sites, Zindarou et Guidimouni, ont présenté des effectifs *d'An. funestus* importants ayant permis l'investigation de leur rôle dans la transmission locale du paludisme. Les échantillons d'*An. funestus* collectés à Guidimouni ont présenté un taux d'infection relativement modéré et stable au cours des trois années étudiées (Tableau 3), témoignant d'un rôle vecteur important, se prolongeant probablement depuis la saison des pluies jusqu'au début de la saison sèche et fraiche en décembre. Les taux d'inoculation plus élevés observés en août 2005 et août 2007 ont été liés à des pics d'abondance importants avec une moyenne de 27,6 et 65,7 piqûres par homme et par nuit, respectivement. En revanche, malgré une moyenne de 10,2 piqûres par homme et par nuit mesurée en août 2006, le taux d'inoculation entomologique était nul du fait d'une absence de femelles *An. funestus* infectées détectées (n = 272). Au vu des faibles abondances d'*An. gambiae* observées à Guidimouni, *An. funestus* apparaît localement comme étant le vecteur principal de *P. falciparum*.

période	indice CSP (%)	EIR journalier
août 2005	1,01 [0,12 - 3,60]	0,28 [0,03 - 0,99]
dec 2005	0,76 [0,09 - 2,71]	0,11 [0,01 - 0,38]
août 2006	0,00 [0,00 - 1,35]	0,00 [0,00 - 0,14]
dec 2006	2,27 [0,28 - 7,97]	0,11 [0,01 - 0,37]
août 2007	0,62 [0,02 - 3,39]	0,41 [0,01 - 2,23]
dec 2007	1,19 [0,03 - 6,45]	0,07 [0,00 - 0,37]
2005	0,87 [0,24 - 2,20]	0,19 [0,02 - 0,69]
2006	0,56 [0,07 - 1,99]	0,05 [0,01 - 0,05]
2007	0,81 [0,10 - 2,91]	0,24 [0,01 - 1,30]
total	0,71 [0,31 - 1,39]	0,16 [0,01 - 0,75]

Tableau 3. Indice sporozoïtique (CSP) et taux d'inoculation entomologique journalier (Nombre estimé de piqûres potentiellement infectantes par homme et par jour) (EIR journalier) d'*An.funestus* à Guidimouni de 2005 à 2007. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre crochets.

A Zindarou, le taux d'infection global d'*An. funestus* pour la période 2004-2005 a été estimé à 1,48% (n = 1965; IC 95% = 0,99-2,08%). Une tendance non significative à la baisse a été observée entre les saisons de transmission 2004 (2,24%) et 2005 (0,88%) (X^2 bilatéral; ddl=1; p=0,0663), principalement due au taux d'infection particulièrement élevé en août 2004 (3,64%; IC 95% = 1,58-7,04%) alors qu'aucune femelle infectée n'a été trouvée en août 2005. Le petit échantillon analysé lors de la saison des pluies 2006 (n=20) n'a pas permis de comparaison avant/après distribution des moustiquaires. Les variations du taux d'inoculation entomologique estimé ont montré un profil semblable au cours des saisons de transmission 2004 et 2005 (Figure 36), hormis la valeur haute d'août 2004, mettant en évidence le rôle d'*An. funestus* dans la prolongation de la transmission en début de saison sèche.

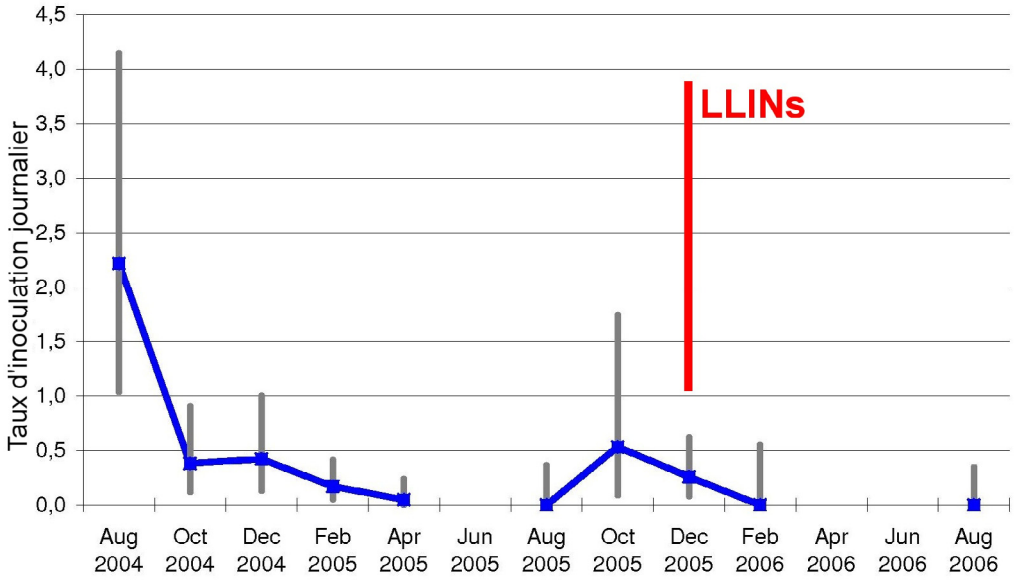


Figure 36. Evolution du taux d'inoculation entomologique journalier d'*An. funestus* estimé à Zindarou d'août 2004 à août 2006 (nombre de piqûres potentiellement infectantes par homme et par nuit). Les barres verticales grises indiquent les intervalles de confiance à 95%. La barre rouge indique la période de mise en place des moustiquaires du programme.

IV. Synthèse et discussion

An. gambiae s.l. a été la principale espèce anophélienne collectée dans tous les villages suivis hormis à Guidimouni, village du centre-est du pays à la faune anophélienne atypique, comprenant *An. hervyi*, espèce majoritaire endémique, vraisemblablement pas ou très peu impliquée dans la transmission locale de *P. falciparum*. A l'exception de Guidimouni et Zindarou où *An. funestus* a joué un rôle significatif dans l'entretien du cycle de transmission de *P. falciparum*, *An. gambiae* s.l. est responsable d'un grande majorité des inoculations dans les villages étudiés, situation qui prévaut probablement dans l'ensemble du Sahel nigérien.

D'importantes variations d'abondance d'*An. gambiae* s.l. ont été mises en évidence : (1) dans le temps, avec des populations plus abondantes durant les mois de mousson, tel que classiquement décrit dans les zones à transmission palustre saisonnière ; (2) dans l'espace, à l'échelle de la bande sahélienne traversant le pays avec des abondances supérieures dans les villages de la moitié ouest du pays, ainsi qu'à petite échelle comme le montrent les importants contrastes observés dans les deux sites suivi longitudinalement, distants de 29 km. La distribution des espèces et formes du complexe *An. gambiae* a également montré des contrastes importants, tant dans l'espace que dans le temps. Nous présentons une carte récente de la distribution des espèces du complexe *An. gambiae* au Niger, indiquant pour la première fois les formes moléculaires d'*An. gambiae* présentes. Les nets gradients d'abondance et de répartition à l'échelle du pays, entre *An. gambiae* à l'ouest et *An. arabiensis* à l'est, sont probablement liés au gradient de pluviométrie, principal facteur influençant la dynamique des populations anophéliennes. En dehors de l'extrême ouest du pays traversé par le fleuve Niger, les eaux de surface sont majoritairement d'origine pluviale et hautement saisonnières. Ces contrastes pourraient être engendrés par les cumuls de

pluies plus faibles à l'est de la zone sahélienne du Niger, mis en évidence par l'inclinaison des isohyètes vers les latitudes inférieures (Figure 12) et la distinction du Sahel Ouest et du Sahel Est sur la base de paramètres climatiques (MAHE *et al.* 2001). Ces conditions seraient ainsi moins propices à la croissance rapide des populations après le début des pluies, et favoriseraient *An. arabiensis* en raison de la meilleure adaptation de l'espèce à l'aridité et aux températures élevées (COETZEE *et al.* 2000; COLUZZI *et al.* 1979; KIRBY and LINDSAY 2009; LEVINE *et al.* 2004). La prépondérance d'*An. arabiensis* à l'est, approximativement entre Zinder et la frontière du Tchad, est cohérente avec les observations faites au Nord Nigéria (COLUZZI *et al.* 1979; ONYABE and CONN 2001a), au Nord Cameroun (WONDJI *et al.* 2005a), ainsi qu'à l'ouest du Tchad (RANSON *et al.* 2009). Au sein d'*An. gambiae* s.s., la forme moléculaire M a été très majoritaire sur la forme S, comme observé en zone sahélienne au nord-est du Burkina Faso (COSTANTINI *et al.* 2009) et à l'est du Mali (SOGOBA *et al.* 2008). La disparition d'*An. gambiae* M vers l'est du transect semble indiquer que la zone échantillonnée a coïncidé avec la limite nord-orientale de distribution de cette forme moléculaire, tout au moins durant les trois années de suivi.

En plus des fluctuations saisonnières des indicateurs entomologiques de la transmission, des variations interannuelles ont été observées, avec notamment une baisse générale d'abondance d'*An. gambiae* s.l. au cours de la saison des pluies 2006, ainsi qu'une tendance globale d'augmentation de la proportion d'*An. arabiensis* dans les échantillons (à l'exception de Zindarou ayant montré une tendance inverse). La chute concomitante des taux d'infection estimée par ELISA a conduit en 2006 à une réduction spectaculaire des taux d'inoculation entomologique. En 2007, les abondances d'*An. gambiae* s.l. ont en revanche été globalement comparables aux valeurs mesurées en 2005. Ces variations peuvent également être traduites en terme de risque de recevoir au moins une piqûre infectée pendant une durée donnée (KRAFSUR and ARMSTRONG 1978) (Voir Chapitre 1 partie V.2.2.A/). En faisant l'hypothèse que le taux d'inoculation entomologique est relativement stable autour du pic de pluviosité et d'abondance d'*An. gambiae* s.l., les estimations obtenues pour les sites du

transect durant la saison des pluies (collectes étalées de juillet à août selon les sites) ont été considérées extrapolables sur une période d'environ deux mois. Cette approximation nous a permis de simuler le risque d'infection sur l'ensemble des sites en fonction du nombre de jours d'exposition durant la saison de transmission (Figure 37). En 2005 le risque d'infection est apparu très élevé dés le premier jour d'exposition et a atteint 100% en 13 jours. En 2006 le risque a fortement chuté, avec un faible risque au cours des premiers jours suivi d'une augmentation relativement progressive avec la durée d'exposition. En 2007 le risque est à nouveau apparu important dés les premiers jours d'exposition. Avec 2005 pour référence, le risque d'infection à sept jours a ainsi chuté de 70% en 2006 et uniquement de 4% en 2007. A 30 jours, la baisse du risque n'était plus que de 20% en 2006 et quasiment nulle en 2007.

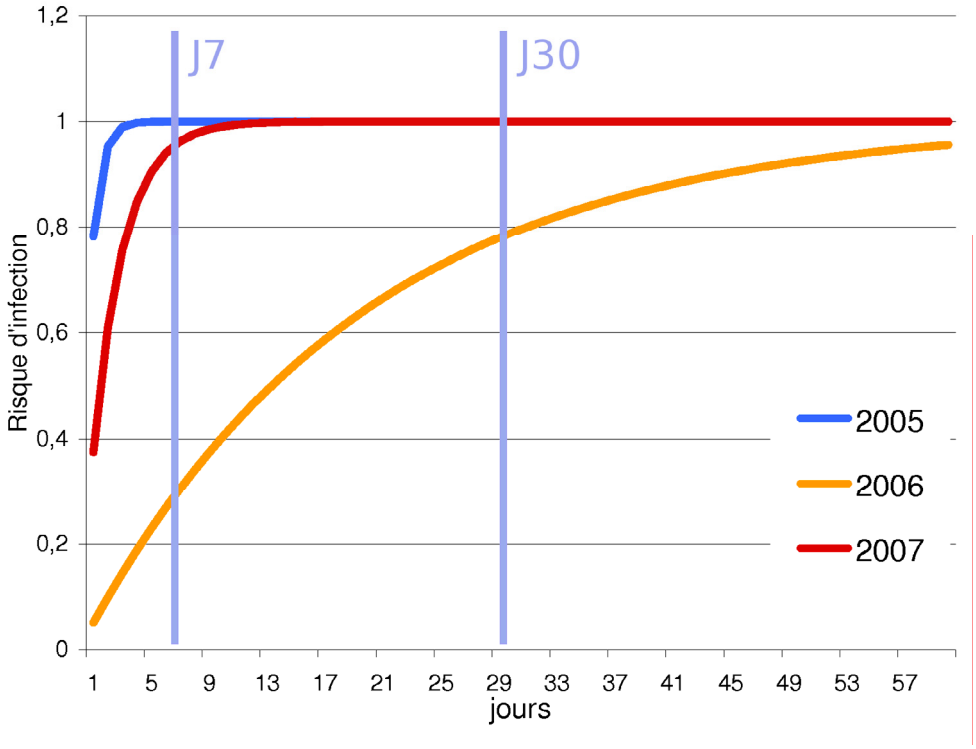


Figure 37. Estimation du risque d'infection dû à *An. gambiae* s.l. en fonction de la période d'exposition (jours), durant la saison des pluies dans l'ensemble des six sites du transect suivis de 2005 à 2007, d'après la formule de Krafsur et Armstrong (1978).

Une hétérogénéité des comportements de piqûre et de repos a été mise en évidence au sein des échantillons d'*An. gambiae* s.l. Le taux d'endophagie supérieur dans les sites de la zone ouest en 2005 et 2006 est cohérent avec la plus forte proportion d'*An. gambiae* s.s. observée dans ces sites et les tendances plus endophages de l'espèce (COLUZZI *et al.* 1979; WHITE 1974), mais ses variations interannuelles n'ont pas suivi de tendance globale sur la période étudiée. L'indice d'endophilie employé a en revanche montré une tendance à la baisse sur la période étudiée, coïncidant avec la mise en place de la couverture nationale en LLINs.

Il se pose bien sûr la question des causes de ces importantes variations de dynamique et de composition des populations, ainsi que de l'intensité de transmission en ayant résulté. Si l'implication de la distribution des moustiquaires imprégnées est une question centrale de ce travail, il est évident que les paramètres environnementaux, et notamment climatiques, conditionnent la dynamique des populations de vecteurs, et qu'il est difficile d'attribuer formellement les variations observées à un paramètre précis. Cette question est d'autant plus sensible que la zone sahélienne présente une variabilité climatique interannuelle importante (LEBEL *et al.* 2003). L'analyse des cumuls pluviométriques annuels provenant d'un réseau national de stations météorologiques (Direction de la Météorologie Nationale, DMN-Niger) a permis d'évaluer les variations de précipitation durant les deux premières années du suivi (Figure 38), apportant des éléments de discussion intéressants. La bande sahélienne a globalement reçu des précipitations moins abondantes en 2006, baisse notamment mise en évidence par l'abaissement des isohyètes 300 et 400mm sur l'ensemble du pays. Les zones de plus fort cumul annuel (> 500mm) ont de plus varié entre les deux années, Localisées à l'ouest dans la zone du fleuve et à l'est de Zinder en 2005, et dans une zone proche de la frontière de Bénin et du Nigéria jusqu'à 6°E environ en 2006. L'analyse du différentiel pluviométrique estimé en 2006 par rapport à 2005, servant de période témoin avant la mise en place des LLINs, montre les déficits plus ou moins importants d'une majeure partie de la bande sahélienne du Niger (Figure 39), en dehors d'une zone

excédentaire correspondant à la fine bande soudanienne ayant reçu les cumuls les plus importants, à proximité de la partie occidentale de la frontière du Nigeria.

Parmi les villages étudiés, on a ainsi distingué en 2006 :

- deux groupes de sites ayant présenté des déficits importants (> 200mm) : Garey et Firgoune à l'ouest ; Damagaram Takaya, Guidimouni, Goudoumaria et Bosso à l'est ;
- un groupe au déficit faible à modéré (0-200mm) au centre : Fararatt, Bermo, Tchake, Falenko ;
- un groupe en léger excès (0-100mm) : Banizoumbou, Zindarou, Maichilmi et Maikogo au centre-ouest.

L'année 2007 a en revanche été marquée par des pluies particulièrement abondantes, tant en terme de cumul pluviométrique que du nombre d'évènements pluvieux, se rapprochant des conditions climatiques de la saison pluvieuse 2005 (DMN 2007).

Le déficit pluviométrique observé en 2006 a pu avoir une influence sur les modifications des populations anophéliennes, dont la forte chute d'abondance d'*An. gambiae* s.l. observée dans la plupart des villages, la baisse de proportion d'*An. gambiae* s.s. par rapport à *An. arabiensis*, et la baisse du taux d'infection à *P. falciparum* des populations. Cependant cette hypothèse n'exclut pas le rôle possible, au moins partiel, du déploiement national des LLINs dans ces modifications. Si l'augmentation de la proportion relative d'*An. arabiensis* est cohérente avec la baisse de pluviométrie observée en 2006 en raison de sa plus grande tolérance à l'aridité, les populations d'*An. gambiae* s.s. pourraient également avoir été affectées plus efficacement par l'intervention. En effet, en raison de leur probable taux d'anthropophilie supérieur, les femelles *An. gambiae* s.s. pourraient connaître plus de difficultés à trouver des sources de sang alternatives lorsqu'un large part de la population humaine est protégée par des moustiquaires imprégnées. Ainsi leur fitness serait plus fortement diminué que celui d'*An. arabiensis* en zone de forte couverture. Une telle hypothèse a été récemment envisagée pour expliquer la baisse de la proportion d'*An. gambiae* s.s. suite à l'augmentation de l'utilisation de moustiquaires imprégnées dans des

villages Kenyans (BAYOH *et al.* 2010). De plus, alors que les précipitations reçues dans la zone lors de la saison des pluies 2007 ont été comparables aux valeurs de 2005, la hausse de proportion d'*An. arabiensis* ainsi que la baisse des taux d'infection à *P. falciparum* se sont maintenues en 2007, suggérant un effet de la couverture nationale en LLINs.

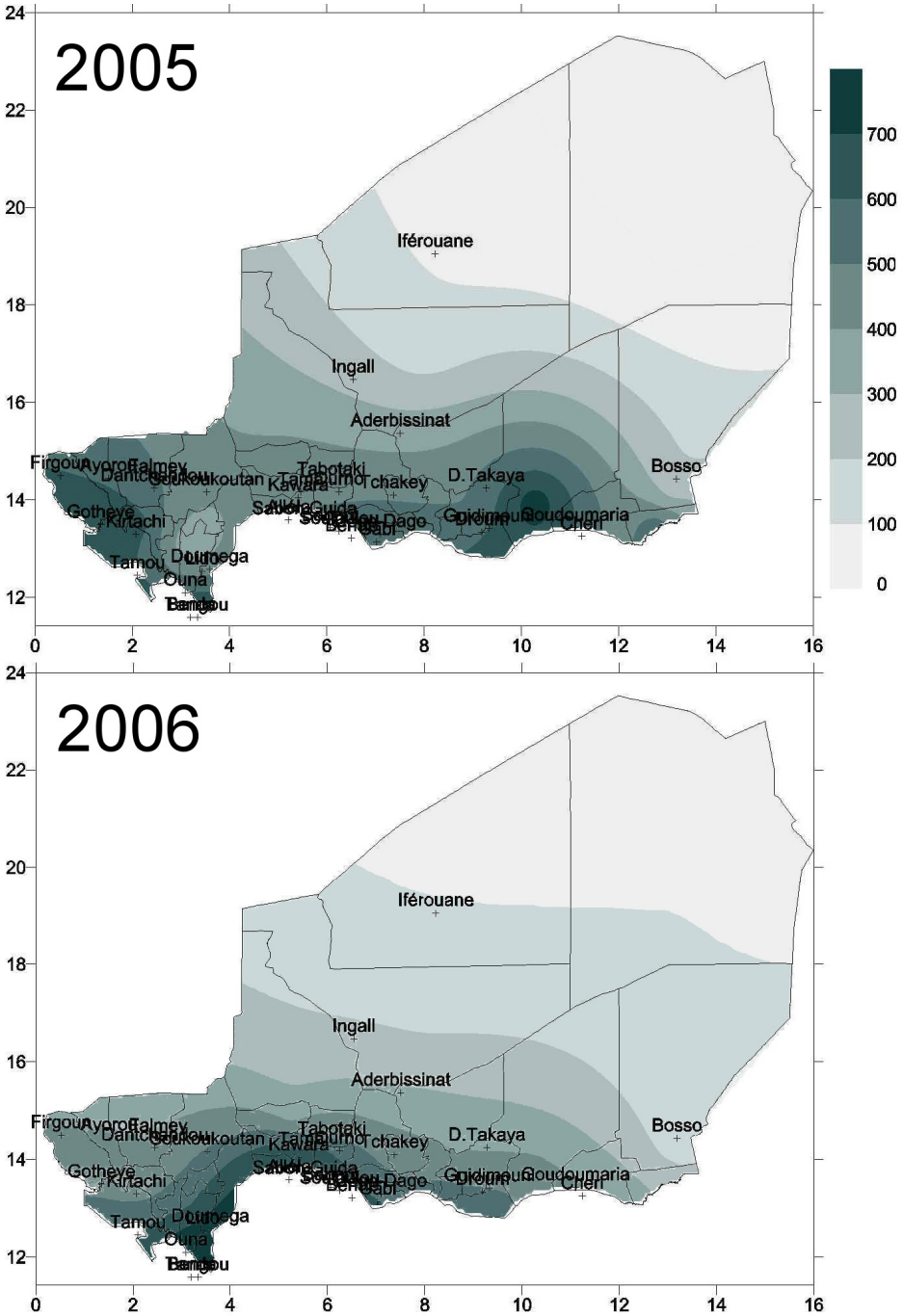


Figure 38. Cumuls pluviométriques annuels (mm) (au 30 octobre) estimés en 2005 (haut) et 2006 (bas). Extrapolation de relevés ponctuels provenant du réseau national de la Direction de la Météorologie Nationale (DMN) du Niger, acquis par le CERMES (I. Jeanne).

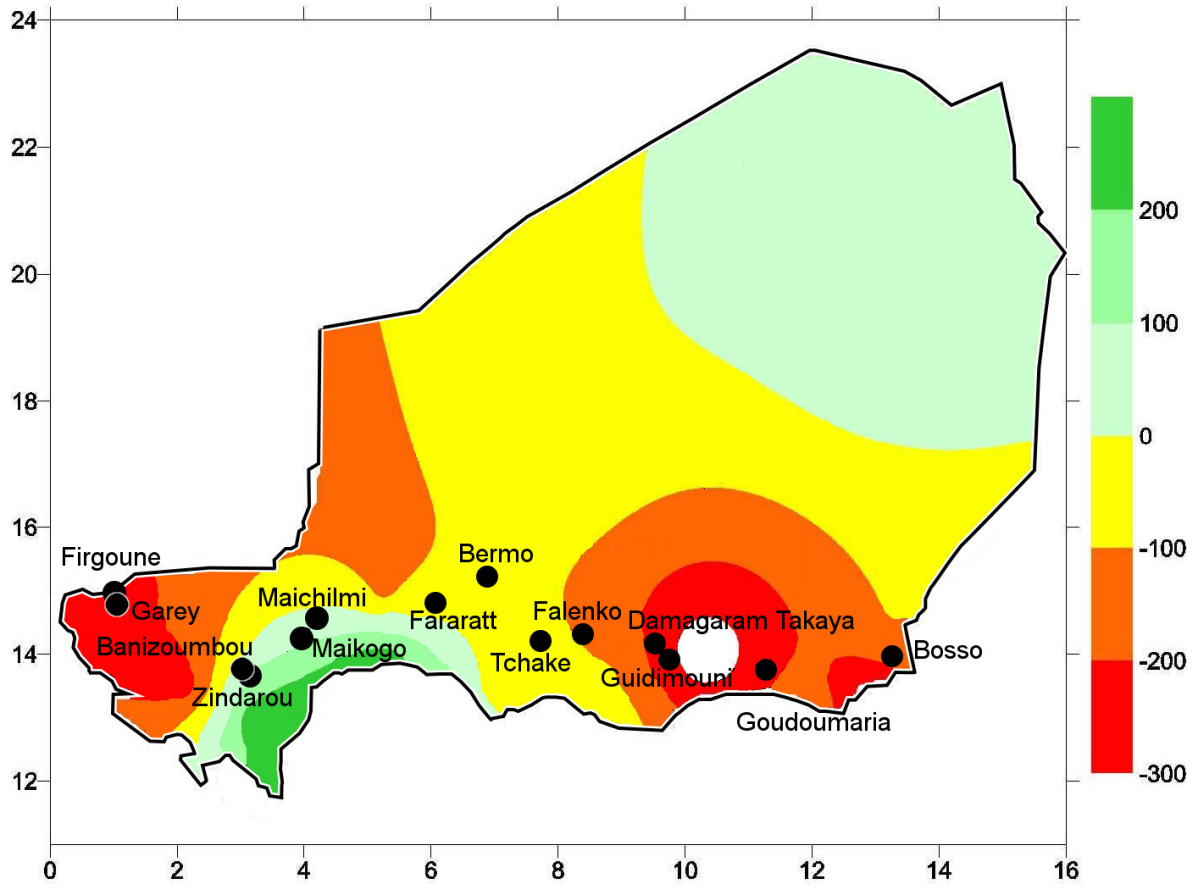


Figure 39. Différence de pluviométrie estimée en 2006 par rapport à 2005. Les zones excédentaires sont représentées en vert, les zones déficitaires en jaune et orangé. Extrapolation de relevés ponctuels provenant du réseau national de la Direction de la Météorologie Nationale (DMN) du Niger, acquis par le CERMES (I. Jeanne).

De même, la baisse de l'indice d'endophilie dans la majorité des villages étudiés en 2007 par rapport à 2005 suggère que les populations d'*An. gambiae* M comme celles d'*An. arabiensis* ont pu être repoussées hors des habitations en plus grande proportion et/ou plus rapidement après la prise d'un repas sanguin, effet possiblement attribuable à la présence des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine. Cet effet répulsif des pyréthrinoïdes a été démontré dans diverses études sur des populations d'*An. gambiae* s.l. (CHANDRE *et al.* 2000; CUZIN-OUATTARA *et al.* 1999; GIMNIG *et al.* 2003b; LINDSAY *et al.* 1989b; MBOGO *et al.* 1996b). On peut cependant supposer que ces variations pourraient également avoir été engendrées par la hausse de la proportion d'*An. arabiensis* dans la plupart des échantillons,

bien que ceux de Zindarou aient montré une tendance inverse, avec une diminution de la proportion d'*An. arabiensis* ainsi que de l'indice d'endophilie.

D'autres paramètres environnementaux ont pu influencer la composition et l'abondance des populations d'*An. gambiae* s.l. à différentes échelles spatiales. Les variations d'abondance présentées entre les villages de Banizoumbou et Zindarou ne peuvent par exemple pas être expliquées par des différences de pluviométrie étant donné leur proximité géographique. Une étude axée sur la modélisation des populations d'*An. gambiae* s.l. à petite échelle dans ces deux villages durant la même période (BOMBLIES *et al.* 2009) a montré l'importance des profils topographiques et hydrologiques locaux, définissant les possibilités de formation et de maintien de collections d'eau propices au développement larvaire au cours de l'année. En effet, alors que Banizoumbou présente un profil typiquement sahélien où les gîtes larvaires sont constitués grâce aux pluies de mousson et relativement temporaires, Zindarou est situé dans une vallée fossile appellée "Dallol Bosso" où des affleurements de la nappe phréatique créent des conditions favorables aux cultures et au développement d'*An. gambiae* s.l. et *An. funestus* durant une partie de l'année. D'une manière générale, à pluviométrie égale, les caractéristiques des sols moduleront donc localement la croissance des populations de vecteurs. Enfin, d'autres opérations de lutte contre le paludisme ont pu être menées, plus ou moins localement, et avoir un effet sur les populations de vecteurs et/ou l'intensité de transmission parasitaire. L'utilisation domestique de répulsifs chimiques est probablement peu répandue dans les zones rurales étudiées, et aucun programme de lutte antivectorielle d'envergure n'a été mené pendant le suivi. On peut signaler l'expérimentation de lutte anti-larvaire à l'aide de graines de neem (*Azadirachta indica*) broyées, menée à Banizoumbou en 2007 (GIANOTTI *et al.* 2008), ainsi que des distributions locales de moustiquaires imprégnées menées par plusieurs ONG. Concernant le traitement des infections à *P. falciparum*, le ministère de la santé a mis en place en 2007 dans l'ensemble des formations sanitaires la gratuité des soins antipaludiques curatifs par les traitements combinés à base d'artémisinine pour les enfants de moins de cinq ans, ayant

pu améliorer la prise en charge des accès et potentiellement participer à réduire l'intensité de transmission homme-anophèle (OKELL *et al.* 2008).

Il apparait donc qu'un certain nombre de facteurs autres que la présence de moustiquaires imprégnées d'insecticide ont pu influencer les indicateurs entomologiques suivis. Ces facteurs ont été discutés, mais leurs influences respectives dans les variations observées ne peuvent pas être démontrées. Dans ce contexte, nous avons utilisé différents marqueurs génétiques permettant de renseigner la nature des modifications des populations. L'étude de la mutation *kdr*, liée au phénotype de résistance aux insecticides pyréthrinoïdes, a permis de tester l'hypothèse d'une sélection des individus sur la base de leur génotype à ce locus par les moustiquaires imprégnées du programme. D'autre part le génotypage de loci microsatellites chez un sous-échantillon de femelles collectées dans plusieurs sites durant les saisons de transmission 2005 et 2006 a permis d'évaluer si l'importante chute d'abondance observée en 2006 a été accompagnée d'une baisse de la diversité génétique.

Chapitre 3. Résistance aux insecticides

L'étude de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes a fait l'objet d'une publication dans *Malaria Journal* (2008, 7:189), présentée ci-après. Les numérotations des figures et tableaux ont été modifiées afin de s'intégrer au présent mémoire. Les tests *in vivo* de sensibilité des populations aux insecticides, initialement envisagés dans ce cadre, n'ont pas été retenus. S'il aurait bien sûr été intéressant de déterminer les profils de résistance phénotypique des populations échantillonnées aux différentes classes d'insecticides, les effectifs parfois faibles collectés sur le terrain, ainsi que l'absence de souche sensible de référence maintenue à l'insectarium ont constitué des obstacles majeurs à leur mise en œuvre. Nous avons par conséquent opté pour l'étude de la mutation *kdr*, déjà observée dans un certain nombre de pays africains, qui semble être le mécanisme majeur impliqué dans la résistance aux pyréthrinoïdes. Ce marqueur génétique est de plus tout à fait adapté à la détection précoce de la résistance, lorsque la mutation est présente dans les populations à faible fréquence et n'engendre pas encore d'effet significatif sur les phénotypes de résistance des populations, tels que détectés par les bio-essais.

Ces résultats revêtent une importance particulière dans le contexte actuel de généralisation de l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes à longue durée d'action en Afrique Sub-saharienne, apportant des indications sur la possible sélection de mécanismes de résistance liée à ces interventions de lutte. Ils constituent de plus la première publication concernant la résistance aux insecticides de populations de vecteurs du paludisme au Niger, contribuant à documenter leur extension géographique et leur évolution temporelle en Afrique de l'Ouest, et en particulier au Sahel où peu d'études ont été menées.

I. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation (Article 1)

Authors : Cyrille Czeher[1], Rabiou Labbo[1], Ibrahim Arzika[1] and Jean-Bernard Duchemin[1]

[1]CERMES (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire), Institut Pasteur International Network, Niamey, Niger

Résumé

Introduction: Une distribution nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide longue durée à destination des populations vulnérables du Niger a été effectuée à la fin 2005. De nombreuses études menées en Afrique ont mis en évidence des populations anophéliennes résistantes à divers insecticides, en partie du fait de la présence de mutations *kdr* (*knockdown resistance*), mais peu de programmes de contrôle opérationnels à grande échelle ont été accompagnés d'un suivi de la résistance des populations de vecteurs. La distribution de la mutation *kdr-w* (Leu-Phe) a été étudiée dans les populations d'*Anopheles gambiae* s.l. du Niger, ainsi que ses variations temporelles suite à la distribution de moustiquaires.

Méthodes: Des collectes de moustiques ont été effectuées dans 14 villages durant les saisons des pluies de 2005, 2006 et 2007 ainsi qu'à Niamey, capitale du pays. Après identification morphologique, des extraits d'ADN de spécimens d'*An. gambiae* s.l. ont été

utilisés pour la détermination des espèces et formes moléculaires, ainsi que pour la détection de la mutation *kdr-w*.

Résultats: Environ 1500 spécimens collectés durant les trois années consécutives ont été analysés. Tous les *Anopheles arabiensis* analysés étaient homozygotes sensibles, tandis que les quelques spécimens de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* ont montré une fréquence élevée de *kdr-w*. Les échantillons de la forme moléculaire M ont présenté une faible fréquence globale de la mutation, mais en augmentation significative au cours des deux saisons des pluies ayant suivi la distribution de moustiquaires. La fréquence de *kdr-w* est également apparue supérieure dans les échantillons de forme M capturés à l'atterrissage en comparaison de la faune capturée au repos dans les habitations. De plus, des résultats préliminaires ont montré une fréquence bien plus élevée dans les formes M capturées en zone urbaine, à Niamey, que dans tous les sites ruraux étudiés.

Discussion: Nous présentons la première description de populations d'*Anopheles gambiae* porteuses de mutations *kdr* au Niger. Il est suspecté que l'augmentation importante de la fréquence de *kdr* observée ici ait été causée par les moustiquaires imprégnées du programme. Même si la mutation *kdr* est toujours peu fréquente, cette expansion rapide pourrait potentiellement aboutir à de fortes fréquences en quelques années.

Conclusion: Ces résultats participent à documenter les effets multiples de programmes opérationnels de contrôle de moustiques vecteurs, afin de concevoir les futures stratégies de contrôle du paludisme.

Abstract

Background: At the end of 2005, a nationwide long-lasting insecticide-treated net (LLIN) distribution targeting the most vulnerable populations was implemented throughout Niger. A large number of studies in Africa have reported the existence of anopheline populations resistant to various insecticides, partly due to knockdown resistance (*kdr*) mutations, but few operational wide-scale control programmes were coupled with the monitoring of such

mutations. The distribution of the *kdr-west* (*kdr-w)* Leu-Phe mutation was studied in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Niger and temporal variations were monitored following the nationwide LLINs implementation.

Methods: Mosquitoes were collected from 14 localities during the wet seasons of 2005, 2006 and 2007 with additional sampling in the capital city, Niamey. After morphological identification of *Anopheles gambiae* s.l. specimens, DNA extracts were used for the determination of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex and for the detection of the *kdr-w* mutation.

Results: Around 1,500 specimens collected in the three consecutive years were analyzed. All *Anopheles arabiensis* specimens analysed were homozygous susceptible, whereas the few *An. gambiae* S forms exhibited a high overall *kdr-w* frequency. The M form samples exhibited a low overall *kdr-w* frequency before the LLINs distribution, that increased significantly in the two wet season collections following the LLINs distribution. Higher *kdr* frequencies were repeatedly noticed within host-seeking females compared to resting ones in indoor collections. In addition, preliminary results in M form urban populations from Niamey showed far higher *kdr* frequencies than in all of the rural sites studied.

Discussion: This study describes the first case of *kdr* mutation in *An. gambiae* populations from Niger. It is suspected that the LLINs have caused the important temporal increase of *kdr-w* mutation observed during this study. While the *kdr* mutation is still found at a low level, this rapid increase could potentially lead to high *kdr* frequencies within a few years.

Conclusions: These results are of prime importance in the effort to document multiple effects of operational control programmes on mosquito vectors, and to conceive sustainable control strategies for future malaria control programmes.

I.1. Background

Plasmodium falciparum, one of the deadliest pathogens circulating in Niger and many other sub-Saharan countries, is contributing significantly to the high estimated child mortality rate (United Nations Children's Fund 2005). The major vectors responsible for *P. falciparum* transmission in Niger are *Anopheles gambiae* sensu lato (s.l.) and *Anopheles funestus*, the former being far more widespread over the country whereas the last is found in more limited areas (LABBO *et al.* 2004). Of the sibling species and forms constituting the *Anopheles gambiae* complex, *Anopheles arabiensis* and both molecular M and S forms of *An. gambiae* sensu stricto (s.s.) have been found to date in Niger (CZEHER *et al.* 2006; ESNAULT *et al.* 2008).

At the end of 2005, a nationwide long-lasting insecticide-treated net (LLIN) distribution targeting the most vulnerable members of the population was organized in conjunction with an integrated poliomyelitis vaccination campaign (LOEWENBERG 2006). This LLIN coverage aimed to reduce morbidity and mortality caused by malaria clinical cases. Such a reduction can be observed when the bed net usage rate in the population is high enough (EISELE *et al.* 2005; FEGAN *et al.* 2007; HENRY *et al.* 2005; SCHELLENBERG *et al.* 2001; TER KUILE *et al.* 2003). Although bed nets were already quite commonly used by the population, principally for protection against biting nuisance mosquitoes, this campaign strongly increased insecticide-treated bed net usage in households all over the country (THWING *et al.* 2008).

The effectiveness of bed nets impregnated with pyrethroid insecticides derives from several mechanisms that decrease the probability of a host-seeking female mosquito to succeed in taking a blood-meal. Besides the physical barrier constituted by the net, a deterrent effect limits unfed mosquitoes entering houses where a treated net is present, and in case of tarsal contact with the treated net, the insecticide compound could repel, hurt, or kill the mosquito. These properties have led to substantial reductions in indoor mosquito

densities, and biting, feeding and survival rates in field trials (GIMNIG *et al.* 2003b; LINDBLADE *et al.* 2006; MAXWELL *et al.* 2003; SOREMEKUN *et al.* 2004) and experimental huts evaluations (CHANDRE *et al.* 1999c; KOLACZINSKI *et al.* 2000; MALIMA *et al.* 2008; N'GUESSAN *et al.* 2007). Some of these studies have also demonstrated a reduction in *P. falciparum* transmission (GIMNIG *et al.* 2003b; LINDBLADE *et al.* 2006; MAXWELL *et al.* 2003).

However, a number of studies throughout Africa have reported the existence of anopheline populations resistant to various insecticides (AWOLOLA *et al.* 2007b; CHOUAIBOU *et al.* 2008; CORBEL *et al.* 2007; KRISTAN *et al.* 2003; N'GUESSAN *et al.* 2007; TIA *et al.* 2006) involving two major types of resistance mechanisms: insecticide target-site insensitivity due to single nucleotide polymorphisms (SNP), and increased enzymatic metabolization of insecticidal compounds (HEMINGWAY *et al.* 2004). Two SNP at amino-acid position 1014 in the voltage-gated sodium channel gene have been described in *An. gambiae* (MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998; RANSON *et al.* 2000a), leading to amino-acid substitutions involved in reducing the affinity of DDT and pyrethroid insecticides for their target site in the insect nervous system. These SNP, named *knock-down resistance* (*kdr*) mutations in relation to their phenotypic expression, were found in many field populations of *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* covering West, Central and East Africa. In West and West-Central Africa, it was shown that the *kdr-w* (or L1014F) allele was far more frequent and widespread in the S molecular form of *An. gambiae* (AWOLOLA *et al.* 2005; CHANDRE *et al.* 1999b; DIABATE *et al.* 2002a; DIABATE *et al.* 2004; ETANG *et al.* 2006; FANELLO *et al.* 2003; KRISTAN *et al.* 2003; REIMER *et al.* 2008; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008; TRIPET *et al.* 2007; WEILL *et al.* 2000; YAWSON *et al.* 2004), whereas only few M form populations from a limited area near the Gulf of Guinea presented *kdr-w* alleles at low frequencies (DIABATE *et al.* 2003; DIABATE *et al.* 2004; ETANG *et al.* 2006; KRISTAN *et al.* 2003; REIMER *et al.* 2008; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008; YAWSON *et al.* 2004), except in few urban and peri-urban coastal areas where it reached high frequencies (AKOGBETO *et al.* 2006; CORBEL *et al.* 2004; GIROD *et al.* 2006; PINTO *et al.* 2007; REIMER *et al.* 2005; TIA *et al.* 2006; TRIPET *et al.* 2006; WEILL *et al.* 2000). However, to date

there have been almost no studies on *kdr* mutations in sahelian *An. gambiae* populations except one in Burkina Faso that included two sites in the sahelian zone of the country (DIABATE *et al.* 2004). No *kdr* M forms were found whereas one village exibited *kdr-w* S forms.

The monitoring of insecticide resistance in malaria vectors is of prime importance especially where control programmes are planned or already running, in order to assess potential selection effects of insecticidal compounds on vector populations, and to take appropriate measures such as switching to other classes of compounds. For this goal, the presence and frequency of the *kdr* mutations constitute a valuable and useful resistance marker for two main reasons. First, it provides an early warning of resistance development as the mutation arises well before any effect on phenotype can be detected in a population (KELLY-HOPE *et al.* 2008). Indeed, the expression of the 24h-survival diagnostic phenotype (WHO 1998) appear to be recessive (CHANDRE *et al.* 2000; CORBEL *et al.* 2004). Therefore, a population presenting a low *kdr* frequency mainly in heterozygous state is likely to show a high mortality rate during bioassays. As further evidences supporting the advantage of *kdr* genotyping over bioassays for emergent resistance detection, (CHANDRE *et al.* 2000) found a significant mortality reduction only when heterozygous females proportion reached 60%, and a significant increase of Knockdown time (KdT) only with 40% heterozygous females. Secondly, the *kdr* mutations seem to be well correlated with resistance phenotype (CHANDRE *et al.* 2000; CORBEL *et al.* 2004; MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998; REIMER *et al.* 2008) in both *An. gambiae* molecular forms, even if metabolic resistance mechanisms could also be involved in increased tolerance to pyrethroids (AWOLOLA *et al.* 2005).

Several authors have studied the effect of insecticide treated nets (ITNs) with pyrethroids on *An. gambiae* populations and the possible selection of *kdr* alleles either in experimental huts trials (ASIDI *et al.* 2005; CHANDRE *et al.* 2000; CORBEL *et al.* 2004; KOLACZINSKI *et al.* 2000) or laboratory experiments (CHANDRE *et al.* 2000; CORBEL *et al.* 2004), helping in the

understanding of advantages conferred by the mutations on survival and blood-feeding in areas of ITN use. However, few data are available on long-term and/or large-scale ITN coverage effect on resistance and *kdr* mutations in natural settings. In East Africa, no selection effect of long-term ITNs use on phenotypic resistance was noticed (KULKARNI *et al.* 2007; VULULE *et al.* 1996), whereas (STUMP *et al.* 2004) reported a significant increase of *kdr-east* mutation frequency in *An. gambiae* S form populations from Kenya after four years of ITNs community use. In West-Central Africa, a rapid increase of *kdr-w* mutation was observed in M forms from the island of Bioko following a large-scale insecticide residual spraying (IRS) programme (REIMER *et al.* 2005; SHARP *et al.* 2007b).

The distribution of the *kdr-w* mutation was studied in *An. gambiae* s.l. populations from the sahelian area of Niger during three consecutive wet seasons, allowing to monitor temporal variations following the nationwide LLIN coverage implemented after the first collection event. This study reports the first documented case of *kdr* mutation in *An. gambiae* populations of Niger and provides crucial information about potential effects of wide-scale LLIN coverage on *kdr* mutation selection.

I.2. Methods

I.2.1. Study area

Niger is a West-African country spanning three bioclimatic zones, with a marked aridity gradient from the southern sahelo-sudanian zone (> 500 mm rainfall per year) to the northern pre-Saharan zone (< 250 mm rainfall per year). Located between these zones, the sahelian zone represents the northern limit of malaria endemicity in the region, and has relatively high human population densities compared to the north of the country, where malaria is more

marginal and epidemic-prone and where *Anopheles* species population densities are very low, highly variable and heterogenous (in prep.).

Apart from describing the distribution of the *kdr-w* mutation in *An. gambiae* s.l. populations in Niger, we monitored its potential variations in frequency and spatial distribution following the countrywide LLIN coverage implemented by the end of 2005 that targeted children under five years of age. The nationwide extent of the campaign prevented us from monitoring control sites without LLIN usage, and the only available methodology was to study the temporal evolution of the *kdr-w* mutation in selected sentinel sites before and after the campaign.

I.2.2. Study design and mosquito collections

Mosquitoes were collected from 14 localities situated in the sahelian zone during the wet season (between July and September) of 2005, 2006 and 2007 (Figure 13). The 2007 collections were made in eight of the 14 initial study sites because of logistical constraints. This sampling scheme allowed us to collect specimens from West to East over a distance of around 1,700 km. In each village, landing catches on human adult male volunteers and indoor spray catches with pyrethroids (Mobil insecticide, Mobil Oil Nigeria, Lagos, Nigeria) were employed following standardized procedures and with agreement of the National Ethics Committee. The 2005 collections were made before the implementation of the nationwide LLIN coverage to provide baseline *kdr* mutation frequency data, whereas the 2006 and 2007 collections were made approximately 7-8 months and 19-20 months after the LLIN distribution, respectively. Additionally, some larval samples collected in Niamey (the capital city) during the 2003 and 2007 wet seasons were included in the study.

I.2.3. Laboratory processing and data analysis

Mosquito species were morphologically identified in the field and put in 96-well microplates with dessicant, and stored between –20 to -28°C in the laboratory before processing. Some specimens identified as *An. gambiae* s.l. were processed for DNA extraction from four to six legs using Chelex-100 resin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), while whole bodies were kept for transmission studies. DNA extracts were used for the determination of species and molecular forms of the *An. gambiae* complex by Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay (SANTOLAMAZZA *et al.* 2004), allowing discrimination of *An. arabiensis*, *An. gambiae* S form, and *An. gambiae* M form. These DNA extracts were then subjected to PCR assay for detection of the *kdr-w* mutation (MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998) with some modifications. As already done (KULKARNI *et al.* 2006) and to get a more reliable genotype determination, we performed two different PCRs, one with primers Agd1 and Agd3 for the detection of the mutant allele, and the other one with primers Agd2 and Agd4 to detect the wild-type allele. Genotypes of every specimen harbouring at least one *kdr-w* allele were confirmed in a second run of both PCR, and a third run was done if the two first results were discordant. The *kdr-east* (Leu-Ser) mutation was not searched for as it is very rare in *An. gambiae* M forms (ETANG *et al.* 2006; N'GUESSAN *et al.* 2007; REIMER *et al.* 2008; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008). The conformance of genotypic frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium expectations was determined by exact test (GUO and THOMPSON 1992) as computed in Arlequin version 3.1.1 (EXCOFFIER *et al.* 2005). All other statistical analysis were performed online with OpenEpi version 2.2.1 (DEAN *et al.*). One-tail p-values were employed for Chi square and Fisher exact tests considering the hypothesis of *kdr* frequency increase over the study period. Also, it should be noted that allelic frequency of the *kdr-w* mutation (number of chromosomes presenting the mutation divided by total number of chromosomes analysed) is always presented rather than frequency of *kdr* specimens (presenting one or two copies of the mutation).

I.3. Results

I.3.1. Global results

One thousand five hundred and seventeen specimens collected in the three consecutive years and different sites were analyzed for the species/forms and the *kdr-w* mutation. 54 individuals (3.6%) could not be genotyped for the *kdr-w* mutation after two to three attempts, and were excluded from further analysis. *An. arabiensis* and *An. gambiae* M form were found in sympatry in all 14 collection sites and all years except in the village of Bosso where only *An. arabiensis* was found. Consequently, detailed *kdr* results for *An. gambiae* M forms will be presented for 13 villages and Niamey. However, important variations of abundances and relative proportions of these two species were observed throughout the country (in prep.), leading to the analysis of small sample sizes in some locations or years for either one or both species. The reliability of the method employed to distinguish *kdr-w* genotypes was good, with 83% of concordance between first and second PCR runs considering only *kdr* M forms from rural areas (n=45). In addition, on 26 *kdr* M forms from Niamey (12 homozygotes and 13 heterozygotes), all gave concordant results between the two runs except one (*kdr/kds* in the first assay, *kdr/kdr* in the second one) giving 96% of concordance.

All 456 *An. arabiensis* specimens analysed were homozygous susceptible *kds/kds* (n=186 in 2005; n=139 in 2006; n=131 in 2007).

Only 19 *An. gambiae* S form specimens were found clustered in four sites (Garey, Banizoumbou, Zindarou and Fararatt), exhibiting an overall *kdr-w* frequency of 50.0%, with five homozygous *kdr/kdr* genotypes, nine heterozygous *kdr/kds* genotypes, and five homozygous *kds/kds* genotypes. The proportion of these genotypes conformed to Hardy-Weinberg equilibrium expectations. Only this global result is given because the low sample size precluded any spatial or temporal variation analysis.

I.3.2. Dynamics of *kdr* frequency in *An. gambiae* M forms

Of the 986 *An. gambiae* M form specimens analysed, 42 specimens harboured one copy of the *kdr-w* mutation, whereas only three specimens were homozygous for the mutant allele, giving an overall *kdr-w* frequency of 2.4%. However, the mutation was not evenly distributed in space and time, and the proportion of sites where at least one *kdr*-harbouring mosquito was found within sufficient sample sizes varied from 5/11 sites in 2005 (45.5%) to 6/8 sites in 2006 (75%), and reached 6/6 sites in 2007 (100%). The genotype distribution was in accordance with Hardy-Weinberg proportions for each year's collection as a whole (all sites).

In the collection of 2005, corresponding to the pre-LLIN period, the mean *kdr-w* mutation frequency was 0.5% (n=537) (Tableau 4). In each of the five sites where the mutation was detected, only one heterozygous *kdr-w* carrier was found, giving frequency estimates ranging from 0.6% (n=86) to 1.6% (n=32). The higher *kdr-w* frequency (8.3%) found in Damagaram Takaya was calculated for six individuals, and may not be representative of the population due to the small sample size. The mean *kdr-w* mutation frequency significantly increased (X^2 = 8.935, p = 0.0014, df = 1) in the 2006 collection (eight months after the LLIN distribution), as 2,0% of all M form specimens tested (n=272) (Tableau 4) harboured the *kdr-w* allele in the heterozygous state only. Within the six locations where *kdr-w* carriers were found, the frequency of the mutation varied from 0.7% (n=71) to 7.9% (n=19). The site that had shown the highest *kdr* frequency within six individuals in 2005 gave similar results in 2006 (n=5),

indicating that the observed *kdr* frequency within only a few individuals might correctly estimate its real occurence in that local population. Also, the 50.0% *kdr* frequency found in Guidimouni must be interpreted with caution as the M form sample represents only one heterozygous female.

Sites	2005		2006		2007		overall	
	n	kdr freq (%) [95% CI]	n	kdr freq (%) [95% CI]	n	kdr freq (%) [95% CI]	n	kdr freq (%) [95% CI]
Firgoune	47	0.00 [0.0-3.8]	17	0.00 [0.0-10.3]	29	10.34 [3.9-21.2]	93	3.23 [1.2-6.9]
Garey	54	0.00 [0.0-3.4]	35	0.00 [0.0-5.1]	-		89	0.00 [0.0-2.1]
Banizoumbou	55	0.00 [0.0-3.3]	52	2.88 [0.6-8.2]	26	7.69 [2.1-18.5]	133	2.63 [1.1-5.3]
Zindarou	49	1.02 [0.0-5.6]	71	0.70 [0.0-3.9]	65	4.62 [1.7-9.8]	185	2.16 [0.9-4.2]
Maichilmi	77	0.00 [0.0-2.4]	10	5.00 [0.1-24.9]	-		87	0.57 [0.0-3.2]
Maikogo	86	0.58 [0.0-3.2]	19	7.89 [1.7-21.4]	34	8.82 [3.3-18.2]	139	3.60 [1.7-6.5]
Fararatt	71	0.70 [0.0-3.9]	53	0.94 [0.0-5.1]	19	7.89 [1.7-21.4]	143	1.75 [0.6-4.0]
Bermo	42	0.00 [0.0-4.3]	4	0.00 [0.0-36.9]	-		46	0.00 [0.0-3.9]
Tchake	32	1.56 [0.0-8.4]	3	0.00 [0.0-45.9]	-		35	1.43 [0.0-7.7]
Falenko	13	0.00 [0.0-13.2]	-		-		13	0.00 [0.0-13.2]
Damagaram	6	8.33 [0.2-38.5]	5	10.00 [0.3-44.5]	-		11	9.09 [1.1-29.2]
Guidimouni	3	0.00 [0.0-15.9]	1	50.00 [1.3-98.7]	4	87.50 [47.3-99.7]	8	50.00 [24.6-75.3]
Total	537	0.47 [0.2-1.1]	272	2.02 [1.0-3.6]	177	9.04 [6.3-12.5]	986	2.43 [1.8-3.2]

Tableau 4. Fréquence allélique de la mutation *kdr-w* dans les échantillons de la forme moléculaire M d'*An. gambiae*, par site et par année. Six sites sur douze on été analysés en 2007. Les sites sont présentés selon leur position longitudinale, de l'ouest ver l'est. Deux sites, Goudoumaria et Bosso, ne sont pas présent en raison de nombre limité de spécimens collectés n'ayant pas permis la détermination de la fréquence de *kdr-w*. n: nombre d'individus analysés. kdr freq: fréquence allélique de *kdr-w* (pourcentage). 95% CI: Intervalle de confiance à 95%

In the 2007 wet season, the mean *kdr* frequency increased again in M form populations reaching 9.0% (X^2 = 23.16, p << 0.001, df = 1) (Tableau 4), and was found in the resistant homozygous state for the first time, in the village of Guidimouni. The number of M form specimens was again low in this locality (n=4), and all were *kdr* carriers with three homozygous *kdr/kdr* females, giving the highest *kdr* frequency found during this study (87.5%). All five other sites presented *kdr* carriers, with allelic frequencies ranging from 4.6% (n=65) to 10.3% (n=29).

Eight of the fourteen initial villages where sampled in 2007. Five of these presented enough sufficient M form sample sizes. The global temporal *kdr-w* frequency variation was also studied considering only those five sites. The results were quite similar, and with all five sites taken together, a highly significant increase of *kdr-w* frequency was detected (X^2 = 40.98, p << 0.001, df = 2), from 0.5% in 2005 to 1.9% in 2006 and 7.2% in 2007. Considering each site individually, only Maikogo presented a significant *kdr-w* frequency increase in the first wet season after the campaign (Fisher exact test, p = 0.019). In the second wet season after the campaign, *kdr* frequency increased significantly in Zindarou (Fisher exact test, p = 0.047) whereas significance was almost reached in Fararatt and Firgoune (Fisher exact test, p = 0.056 and 0.057, respectively). When comparing 2005 *versus* 2007 collections, all five sites except Zindarou presented a significant increase of *kdr* allelic frequency.

I.3.3. *Kdr* frequency analysis by collection methods

The above results were presented without differentiation of collection methods, however they are meaningful because the proportion of tested individuals collected by each method was homogenous for the different years of collection (X^2 = 1.439, p = 0.487, df = 2 for five sites from Table 5; X^2 = 5.377, p = 0.0679, df = 2 for all sites). However, when analysing separately sub-samples of M forms collected by different methods, we found different *kdr-w*

frequencies, with a trend towards higher values for host-seeking mosquitoes collected by landing catches inside dwellings compared to indoor resting mosquitoes collected by spray catches (Figure 40). This trend was seen for each year but the difference was statistically significant only for 2007 (X^2 = 3.232, p = 0.036, df = 1) and for global results over all years (X^2 = 7.392, p = 0.003, df = 1). In addition, we observed quite constantly around two-fold higher *kdr-w* frequencies in host-seeking females.

		2005		2006		2007		overall	
Site	Collection	n	freq kdr (%)	n	freq kdr (%)	n	freq kdr (%)	n	freq kdr (%)
Banizoumbou	ILC	12	0.00	18	5.56	-		30	3.33
	IRC	35	0.00	24	2.08	26	7.69	85	2.94
	total indoor	47	0.00	42	3.57	26	7.69	115	3.04
Fararatt	ILC	35	0.00	15	0.00	7	14.29	57	1.75
	IRC	32	0.00	31	1.61	10	5.00	73	1.37
	total indoor	67	0.00	46	1.09	17	8.82	130	1.54
Firgoune	ILC	24	0.00	5	0.00	21	14.29	50	6.00
	IRC	23	0.00	8	0.00	8	0.00	39	0.00
	total indoor	47	0.00	13	0.00	29	10.34	89	3.37
Maikogo	ILC	45	1.11	8	12.50	27	11.11	80	5.63
	IRC	15	0.00	7	7.14	7	0.00	29	1.72
	total indoor	60	0.83	15	10.00	34	8.82	109	4.59
Zindarou	ILC	22	0.00	52	0.96	50	5.00	124	2.42
	IRC	6	0.00	2	0.00	15	3.33	23	2.17
	total indoor	28	0.00	54	0.93	65	4.62	147	2.38
total	ILC	140	0.36	99	3.03	105	9.05	344	3.67
	IRC	111	0.00	72	2.08	40	2.50	223	1.81
	total indoor	251	0.20	171	2.63	145	7.24	567	2.88

Tableau 5. Fréquence allélique de la mutation *kdr-w* chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae*, par site, année et méthode de capture. Le tableau présente les données des cinq villages analysés durant les trois années et où suffisamment de spécimens ont été collectés. n: nombre de spécimens. freq kdr: fréquence allélique de la mutation *kdr-w* (pourcentage). ILC: Captures à l'aterrissage de la faune agressive à l'intérieur. IRC: Capture de la faune résiduelle à l'intérieur.

By focusing again on the five villages used for temporal variation analysis, but considering only host-seeking females collected inside, the global increase of *kdr-w* frequency from 2005 to 2007 was also highly significant (X^2 = 25.35, p << 0.001, df = 2)

(Tableau 5), however it was not the case when considering only resting females, giving only an increasing trend between 2005 and 2006 (Fisher exact test, p = 0.060).

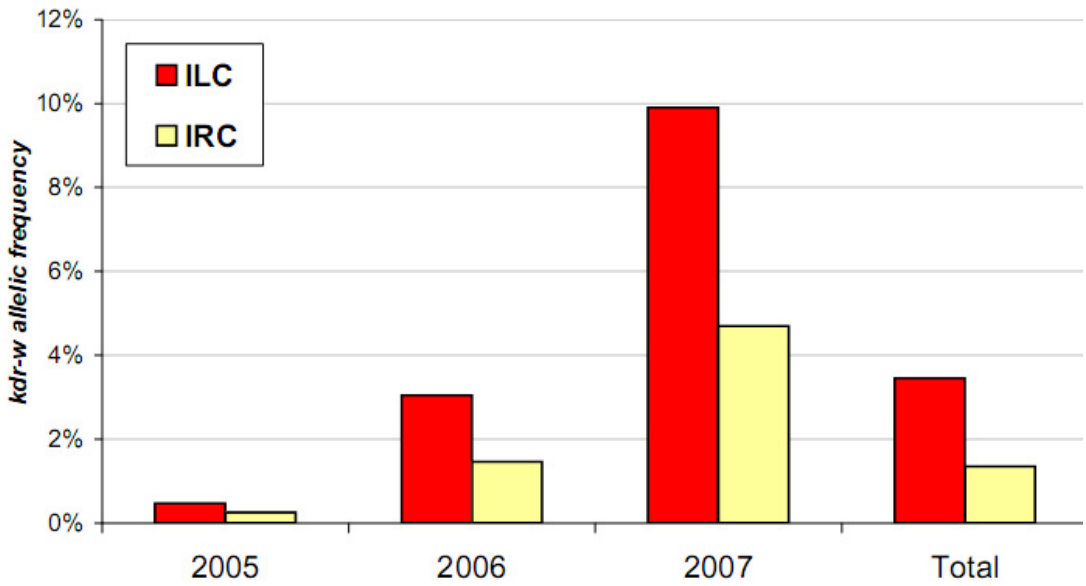


Figure 40. Fréquence allélique moyenne (tous villages confondus) de la mutation kdr-w chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae*, par année et méthode de capture. ILC: Captures à l'aterrissage de la faune agressive à l'intérieur. IRC: Capture de la faune résiduelle à l'intérieur.

I.3.4. Preliminary results for urban M form populations

Thirty four *An. gambiae* M form females sampled as larvae in Niamey during 2003 and 53 during 2007 were also analyzed. Several sites were sampled in 2003, whereas only one site was sampled in 2007, near a small stream called Gountou Yena (Figure 41). *Kdr* frequency was 32.4% in 2003 and reached 71.7% in 2007, constituting a highly significant increase (X^2 = 26.07, p << 0.001, df = 1). When analysing only the larval samples from the Gountou Yena stream, *kdr* frequency was 43.3% in 2003 (n=15) and the 2003-2007 increase was still significant (X^2 = 8.318, p = 0.002, df = 1). In addition, considering the 2003 collections, this *kdr* frequency in the Gountou Yena area was significantly higher compared

to other breeding sites in Niamey (X^2 = 2.957, p = 0.043, df = 1) where the mean frequency was 23.7%.

Figure 41. Vue du Gountou Yena durant le début de saison des pluies (juin 2008), montrant le petit cours d'eau bordé de végétation et de zones de maraîchage à petite échelle (en haut à gauche), où de fortes fréquences de la mutation *kdr* ont été observées chez *An. gambiae* M.

I.4. Discussion

This study describes the first case of *kdr* mutation-harbouring *An. gambiae* populations from Niger, to contribute to the description of the spatial distribution of *kdr-w* mutation across West Africa, especially in the northern limits of *An. gambiae* distribution area where such

data are very rare. Fully susceptible genotypes were found in every *An. arabiensis* sample. This result is consistent with other studies from neighbouring countries where *An. arabiensis* exhibited very few if any *kdr* alleles (CHOUAIBOU *et al.* 2008; DIABATE *et al.* 2002b; DIABATE *et al.* 2004). Despite the fact that our S form sample was too limited to describe spatial and temporal dynamics of *kdr-w* mutation, its high prevalence is nevertheless interesting. The cause of mutation maintenance without significant insecticide pressure is unknown, as the mutation frequency was actually already 39% (n=13) before the LLIN distribution.

The collected specimens allowed a more detailed study of M form populations throughout the country. It suggests that *kdr-w* mutation was already present at a low level in M form populations before the nationwide LLIN distribution, in various localities distributed all over the sahelian zone, at longitudes ranging approximately from 1°E to 10°E and latitudes below 16°N. This finding greatly extends the area of known *kdr*-carrying M form populations, that was to date limited to more humid areas in Côte d'Ivoire (GIROD *et al.* 2006), Ghana (YAWSON *et al.* 2004), Burkina Faso (DIABATE *et al.* 2003; DIABATE *et al.* 2004), Benin (CORBEL *et al.* 2007; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008), Nigeria (AWOLOLA *et al.* 2007b; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008), Cameroon (ETANG *et al.* 2006; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008), Equatorial Guinea (MORENO *et al.* 2008; REIMER *et al.* 2005) and Angola (JANEIRA *et al.* 2008). The mutation frequencies encountered are consistent with studies from neighbouring countries where *kdr-w* frequency was usually low in M molecular form : 6% in Malanville, Northern Benin, near the Nigerien border (CORBEL *et al.* 2007), 0.7% in Koubri (YAWSON *et al.* 2004) and 2% in VK7, southern Burkina Faso (DIABATE *et al.* 2004).

Based on strong supporting results, several authors (CHOUAIBOU *et al.* 2008; CORBEL *et al.* 2007; DIABATE *et al.* 2002a; FANELLO *et al.* 2003; TRIPET *et al.* 2007; VERHAEGHEN *et al.* 2006; YAWSON *et al.* 2004) hypothesized that past and current agricultural use of pyrethroids and DDT for crop protection led to the selection of resistant individuals by challenging larval stages with residual insecticide products accumulating in water bodies around cultivated

areas. This hypothesis was recently supported (AKOGBETO *et al.* 2006) by showing indirectly the presence of pesticide residues in soil and water from vegetable gardens and farms in Benin that limited the emergence rate of challenged larvae. We could relate our pre-LLIN low global *kdr* frequency to the presumed limited environmental selection pressure on *An. gambiae* populations, as the rural areas studied are usually surrounded by seasonal millet and/or sorghum subsistence cultivation for local consumption. These farming practices employ negligible amounts of pesticides. Unreliable precipitation and limited commercial demand tend to keep the use of inputs such as chemical fertilizer, pesticides and hired labour to a minimum (ICRISAT/FAO 1996). However, several localized mosquito populations might experience more pyrethroid exposure, especially in irrigation and gardening zones where agricultural production demands and allows financially insecticide use. Urban domestic use of pyrethroids for personal protection was also suggested to favor the emergence of resistant individuals within mosquito populations (DIABATE *et al.* 2002a; PINTO *et al.* 2006). Indeed, the highest *kdr* frequencies ever detected in M forms were found around important cities in Côte d'Ivoire (GIROD *et al.* 2006) and Benin (AKOGBETO *et al.* 2006; CORBEL *et al.* 2007; WEILL *et al.* 2000), corroborating the hypothesis of high insecticide pressure within urban environnements. In addition, it seems that M form populations breeding inside the city of Niamey also present high *kdr-w* frequencies, far greater than any analysed rural site. Some of the sampled larval populations were breeding near a small stream that crosses the city and is surrounded by year-round vegetable cultivation areas. We therefore cannot attribute potential selection effects to gardening and/or domestic insecticide use, but strongly suspect far higher insecticide exposure due to crop protection treatments. This hypothesis is sustained by the higher *kdr* frequency found near the cultivation areas compared to other larval habitats in Niamey. We conducted a basic interview in the cultivation areas, all 24 people reported repeated insecticide use along the year, bought in local market places. These multiple potential sources of pyrethroid pressure are common in many sub-Saharan urban and peri-urban areas (AKOGBETO *et al.* 2006; CORBEL *et al.* 2007; GIROD *et al.* 2006; WEILL *et al.* 2000), and are primarily due to the presence of cultivated

zones in the outskirts of cities. These local situations prevent a clear identification of factors responsible for the high resistance levels detected.

Compared to the pre-LLIN 2005 collections, a significant four-fold increase of global *kdr-w* mutation frequency was observed in the 2006 wet season, around 7-8 months after the nationwide LLIN distribution, again followed by a similar four-fold increase between 2006 and 2007 wet seasons. Although suspected, the selective pressure exerted by the nationwide LLIN coverage causing the *kdr* increase within mosquito populations cannot be demonstrated (mainly due to absence of control zones). Even though it is at a quite low level, this fast and linear increase could potentially lead to high *kdr* frequencies within a few years. A similar trend was reported in *An. gambiae* S form populations from West Kenya (STUMP *et al.* 2004) after four years of ITNs trials in a 200 km^2 area whereas no variation was observed in control zones without ITNs. SHARP *et al.* (2007b) also reported an increasing *kdr-w* frequency in M forms from Bioko Island (Equatorial Guinea) in response to an IRS programme. On the same island, REIMER *et al.* (2005) found a high allelic frequency in urban and peri-urban areas one year after the beginning of residual pyrethroids spraying, that they compare to the absence of *kdr* alleles reported before the IRS programme (BERZOSA *et al.* 2002). However, it should be noted that BERZOSA *et al.* (2002) analysed only ten larvae at each collection site, resulting in a high probability of missing *kdr* alleles present at low to moderate frequency. Indeed, a null *kdr* frequency within ten individuals gives a 95% Confidence Interval upper bound of 16.8%, that means a 95% probability to find no *kdr* allele in the sample although present at a frequency below 16.8% in the population. A similar rapid *kdr* frequency increase was reported in Abidjan (Côte d'Ivoire) from no *kdr* alleles around 1998 (n=30) (MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998) to 39% around 1999 (n=27) (CHANDRE *et al.* 1999b) and 70% in 2004 (GIROD *et al.* 2006), with the last sample collected in an outdoor deltamethrin-spraying area (n=103). Unfortunately the two first studies pre-dated the description of *An. gambiae* molecular forms so we cannot exclude an effect of variation in molecular form proportions on *kdr* frequency. These studies and our results suggest a

selection effect of large-scale insecticide-based control programmes on *kdr* mosquitoes. However, a recent study in Mali (TRIPET *et al.* 2007) showed increasing *kdr* frequencies in S forms from three villages between 1993 and 2004 that were attributed to agricultural and domestic pyrethroid use in absence of any wide-scale control programme. Also, under the hypothesis of a recent introgression of the *kdr-w* allele from S to M form in southern forest areas, we cannot rule out the possibility that the global increase we described is simply due to current spatial expansion of the mutation in West Africa.

Marked seasonality and a short rainy season condition the annual expansion of mosquito populations and the start of a new malaria transmission season. Each new malaria transmission season's increased mosquito abundance stimulates the Sahel inhabitants to use their impregnated bed nets. Indeed, the nationwide LLINs distribution campaign took place during the beginning of the dry season when usually very low mosquito densities are found throughout the sahelian zone. Our personal observations of low LLIN usage before the wet season (R. Labbo, unpublished) were confirmed by the recently published coverage and usage study (THWING *et al.* 2008) and are consistent with this low biting nuisance. This fact could have important implications in terms of potential selective pressure exerted by the LLIN, that would consequently be highly seasonal and co-occurrent with the fast increase of mosquito population size soon after the beginning of the rainy season. The long-term effect of such explosive patterns of mosquito populations dynamics and LLIN usage on insecticide resistance is unknown, but could potentially differ from more humid zones where populations are more stable along the year. Also, this delay between bed nets distribution and maximal usage rate (around six months after) could also have delayed the start of the resistance increase, and could explain the low kdr frequency in 2006 only a few months after the nets began to be used largely.

Concerning our finding of lower *kdr* frequency within resting compared to host-seeking mosquitoes, the most likely hypothesis is directly linked to the collection method. The resting collections used pyrethroids (0.25% tetramethrin/0.05% cyphenothrin/0.04% prallethrin) and

could therefore have preferentially killed susceptible *kds/kds* females whereas at least a portion of *kdr* females could have escaped or stayed on walls and ceilings without being knocked down by the spraying. If this hypothesis was true, one should consider the collection method employed when comparing published studies or planning field collections as it could bias the *kdr* frequency values. In addition, It seems unlikely that the observed variation between collection methods is due to different sub-populations within the domestic environnement. Resting females may have taken a blood-meal one or two days before and constitute the same population that blood-seeking females collected by indoor landing catches.

Once *kdr* mutations are found in a population, one important issue would be to determine to what extent it could decrease the benefits of control programmes. The relationship between *kdr* genotypes and resistance phenotypes was partly unraveled by laboratory studies (CHANDRE *et al.* 2000; CHANDRE *et al.* 1999b; CORBEL *et al.* 2004; MARTINEZ-TORRES *et al.* 1998; REIMER *et al.* 2008) and experimental huts trials (CORBEL *et al.* 2004; KOLACZINSKI *et al.* 2000), but we are far from a full understanding the role of *kdr* mutations on mosquito survival in the field. Therefore, we can only speculate on the *kdr* frequency required to measure a significant effect on insecticide resistance. Some studies give however interesting indications about the personal and/or community protection provided by insecticide materials or treatments in areas of *kdr* populations. SHARP *et al.* (2007b) reported a reduced infection rate after an IRS programme with pyrethroids on *An. gambiae* M form populations exhibiting around 40% *kdr* frequency, however the abundances were only decreased after a shift towards carbamate spraying. The recent study of N'GUESSAN *et al.* (2007), although conducted in semi-field conditions with experimental huts and artificially holed bed nets, gives interesting clues because the same experiments were run in two contrasting environments of *kdr* frequency in M form populations. The personal protection provided by the treated holed nets was good when *kdr* frequency was 6%, but was much decreased when kdr frequency was around 80%. In addition, in a peri-urban area of Abidjan,

Côte d'Ivoire, with M form populations with a *kdr* frequency of 70% (GIROD *et al.* 2006), a spatial spraying programme of deltamethrin and fenitrothion in conjunction with deltamethrin-treated bed net usage in a french military camp did not significantly reduce the mosquito biting rates.

Therefore, as the present results indicate still low *kdr* frequencies mainly in the heterozygous state, it is unlikely that the current spread of the mutation has to date any significant effect on resistance phenotype and resulting efficacy of LLIN. However, it is feared that this continuous spread of *kdr-w* mutation could rapidly impede current efforts to reduce malaria transmission by implementing large-scale pyrethroid-treated nets coverage.

I.5. Conclusions

These results are of prime importance in our effort to document multiple effects of operational control programmes on mosquito vectors, and to conceive sustainable control strategies for the future. As an increasing number of African countries plan to develop and scale up malaria control strategies including large vector control implementation, continued monitoring for insecticide resistance will be of utmost importance in a context of increasing extensive pyrethroid exposure. The documentation of the factors contributing to resistance selection within those populations is also highly important. Nevertheless, the long-term sustainability of such programmes will not be achieved without the availability of alternative insecticidal compounds that could replace pyrethroids for bed net impregnation where they would appear inefficient due to *kdr* mutations and/or other resistance mechanisms.

Authors' contributions

CC carried out the molecular processing, the analysis and interpretation of data, and contributed to the drafting of the manuscript; RL participated to the conception of the study and the field samples collection and identification; IA participated to the collection and identification of the samples and the molecular processing; JBD conceived and coordinated the study, and contributed to the interpretation of data and the drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the CERMES Parasitology unit staff for logistical and technical support during field and laboratory work. We acknowledge Fabrice Chandre and Jocelyn Ratovonjato for kindly providing positive controls for *kdr* mosquitoes and S form specimens, respectively. We are grateful to Arne Bomblies for useful comments and corrections on the draft. We thank villagers from all studied sites for their collaboration. The study and CC's doctoral fellowship were funded by the IVth round of the Global Fund attributed to Niger through the International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies for the two first years, and by the World Health Organization (APW AF/07/266865) for the third year of the project.

II. Données complémentaires

Suite à la publication de cet article, plusieurs études ont fourni des éléments intéressants concernant la résistance de populations d'*An. gambiae* s.s. aux insecticides ainsi que les facteurs potentiellement impliqués dans la sélection des mécanismes responsables. Le suivi de populations d'*An. gambiae* S dans les hautes terres burundaises (PROTOPOPOFF *et al.* 2008), au cours d'un programme de contrôle du paludisme ayant utilisé des aspersions intradomiciliaires et des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes pendant quatre ans, a mis en évidence une faible fréquence de la mutation *kdr-e* durant les deux premières années, suivi d'une augmentation forte et continue durant les quatre années suivantes. Bien que les interventions de contrôle étaient limitées dans l'espace et conduites dans une zone biogéographique particulière, cette étude a fourni une preuve supplémentaire du risque de sélection d'individus résistants aux insecticides par les programmes opérationnels. De plus, l'utilisation parfois abusive de pyréthrinoïdes pour le traitement de cultures maraîchères urbaines ou péri-urbaines a été de nouveau incriminée comme source de sélection de populations d'*An. gambiae* résistantes au Bénin (YADOULETON *et al.* 2009), ayant montré des baisses de mortalité et des fréquences de *kdr-w* importantes, en concordance avec nos résultats préliminaires pour la ville de Niamey. La situation de la résistance des populations d'*An. gambiae* au Burkina Faso a également été récemment actualisée (DABIRE *et al.* 2009), ayant confirmé le rôle des cultures cotonnières dans la sélection de la mutation *kdr* (DIABATE *et al.* 2002a) et mis en évidence des fréquences de *kdr-w* moindres vers le nord du pays, jusqu'à l'absence de la mutation dans les quelques sites sahéliens étudiés. D'autre part, la fréquence de la mutation chez la forme moléculaire S est restée stable entre 2000 et 2006, tandis qu'elle a dans le même temps fortement augmenté chez la forme M, probablement en

rapport avec la hausse importante des surfaces allouées à la culture de coton dans l'ouest du pays, donc des quantités d'insecticides répandues dans l'environnement.

Afin d'apprécier la pression insecticide exercée sur les populations culicidiennes par la distribution de moustiquaires organisée au Niger, il est nécessaire d'évaluer leur présence et leur utilisation dans les foyers. Deux enquêtes de couverture ont été menées par le CDC (Atlanta, USA) en collaboration avec l'OMS-AFRO et le PNLP du Niger en janvier 2006, pendant la saison sèche, puis en septembre 2006 pendant la saison des pluies (THWING *et al.* 2008). La possession de moustiquaires imprégnées d'insecticides dans les ménages au niveau national est passée de 6% avant la distribution à 65% après, tous ménages confondus, et 75% dans les ménages avec enfants de moins de cinq ans, sachant que 87% des enfants ciblés ont reçu la vaccination contre la poliomyélite. Ces chiffres de possession ont conduit à un taux d'utilisation faible durant la saison sèche 2006, soit 15% des enfants ciblés, qui a en revanche atteint 55% lors de la saison des pluies suivante. Ce type d'utilisation saisonnière de la moustiquaire, liée aux nuisances culicidiennes concentrées autour de la saison des pluies, est fréquente au Niger, et a été mise en évidence dans des contextes de transmission saisonnière dans d'autres pays d'Afrique (KORENROMP *et al.* 2003). Lors des missions effectuées dans le cadre du suivi transversal de la transmission par le CERMES, des observations sur l'utilisation des moustiquaires ont également été faites. Ces données ne sont pas à opposer à l'enquête de couverture du CDC, qui visait une représentativité nationale, mais fournissent des indications pertinentes de l'utilisation des moustiquaires du programme dans les villages suivis par le CERMES, d'où proviennent les échantillons de vecteurs étudiés dans ce travail. Ces données ont également mis en évidence l'utilisation répandue de moustiquaires non imprégnées au Niger, ainsi que l'importante hausse de l'utilisation des moustiquaires imprégnées (tableau 6), particulièrement importante dans les populations ciblées par le programme pendant le pic d'abondance culicidienne et de transmission palustre au mois de septembre (tableau 7). En

effet, à cette période le taux d'utilisation global sur l'ensemble des sites a été estimé à plus de 80% pour les enfants de moins de cinq ans, contre 34% pour les enfants plus agés.

	2005		2006		
Population générale	Pluies	Sèche froide	Sèche chaude	Pluies	Sèche froide
Effectif	162	164	164	152	88
non protégés	43%	62%	56%	39%	45%
moustiquaire	57%	38%	37%	33%	20%
moustiquaire imprégnée	0%	1%	7%	28%	34%

Tableau 6. Utilisation de moustiquaires simples et imprégnées dans les douze villages du suivi transversal de la transmission palustre en 2005 et 2006, tous sites et âges confondus, dans les ménages investigués (CERMES, non publié).

Classe d'âge	type de moustiquaire	Juillet 2007	Septembre 2007	Décembre 2007
Enfants < 5 ans	moustiquaire	85,4%	72,2%	76,5%
	moustiquaire imprégnée	34,7%	83,5%	46,0%
	LLIN	33,8%	82,7%	44,3%
Enfants 5-15 ans	moustiquaire	64,9%	79,0%	72,6%
	moustiquaire imprégnée	14,8%	35,0%	23,5%
	LLIN	14,0%	34,1%	23,3%

Tableau 7. Utilisation de moustiquaires simples et imprégnées dans les douze villages du suivi transversal de la transmission palustre en 2007, chez les enfants de moins de cinq ans et les enfants de cinq à quinze ans, tous sites confondus. LLIN, Long-Lasting Insecticidal Net (Moustiquaire imprégnée longue durée) (CERMES, non publié).

Les données de l'enquête de couverture menée à différent moments de la saison de transmission 2007 sont intéressantes à séparer par village. Le nombre moyen de LLIN par maison était très variable en début (juillet) et fin (décembre) de saison des pluies, probablement en raison de périodes différentes de croissance puis de décroissance

saisonnière des populations selon les conditions environnementales locales (Figure 42). Au moment du pic d'abondance vers le mois de septembre, il a en revanche suivi une nette tendance liée à la position des sites le long du transect longitudinal, avec un nombre moyen de LLIN plus élevé dans les sites localisés vers l'est.

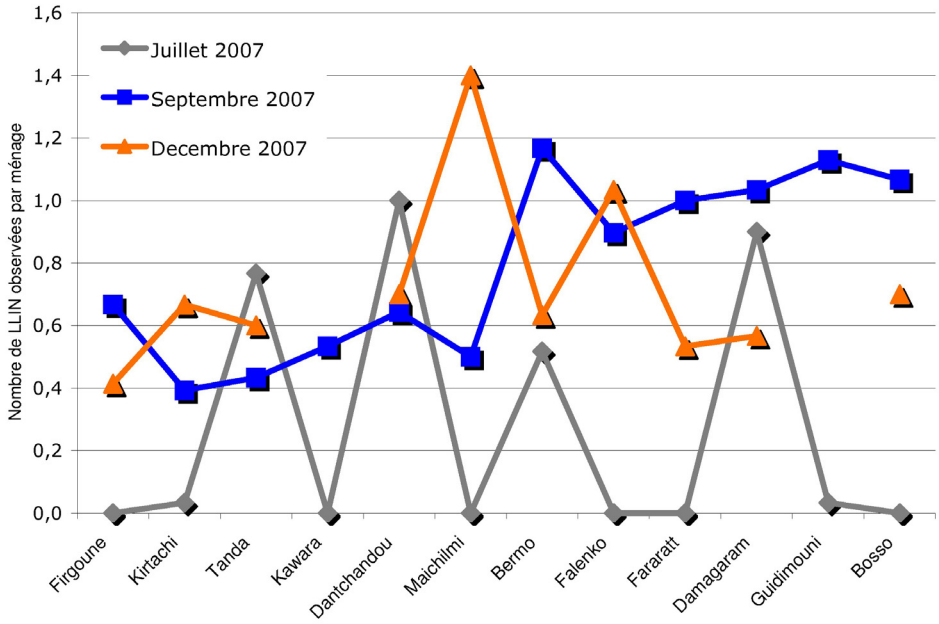


Figure 42. Observation du nombre de LLIN suspendues dans les ménages des villages du suivi transversal, en début (juillet), pic (septembre) et fin (décembre) de la saison des pluies 2007 (moyenne sur 30 maisons par village et passage). Les sites en abscisse sont présentés d'après leur position longitudinale relative.

Globalement, ces enquêtes s'accordent sur la forte hausse du taux de possession de moustiquaires imprégnées d'insecticide observée suite à la distribution nationale de fin 2005, ainsi que sur leur utilisation saisonnière, durant les quelques mois de saison pluvieuse et de nuisance culicidienne. D'après l'enquête du CDC (THWING *et al.* 2008), sur tous les ménages où aucune moustiquaire n'était accrochée durant la saison sèche, 68% ont déclaré ne pas se protéger car ils pensaient qu'il n'y avait pas de moustiques. En l'absence présumée de pression insecticide significative autre que celle causée par les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes, notamment du fait des pratiques agricoles de subsistance n'utilisant pas ou peu d'insecticides, il semble donc qu'une utilisation de moustiquaires imprégnées concentrée

durant quelques mois de l'année puisse dans certaines conditions sélectionner la mutation *kdr* dans les populations de vecteurs de manière à entrainer une hausse régulière de sa fréquence. Le profil de variation du nombre de LLIN selon la longitude durant le pic d'abondance et de transmission palustre est intéressant. Il semble en contradiction avec les plus faibles abondances d'*An. gambiae* s.l. observées vers l'est du transect, mais pourrait être lié au niveau de nuisance engendré par les populations de *Culex* sp. et *Mansonia* sp., sympatriques dans la plupart des sites. De plus, ce profil ne peut être relié a la mutation *kdr* étudiée, étant donné que (1) les populations d'*An. gambiae* M sont principalement présentes dans l'ouest et le centre jusqu'à Fararatt et n'ont pas montré de variation selon les sites, (2) les populations d'*An. arabiensis* majoritaires dans la zone est n'ont pas présenté la mutation *kdr*.

Chapitre 4. Structure génétique des populations

L'étude de la structure génétique des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. a été publiée dans *Journal of Medical Entomology* (2010, 47:355-366). La deuxième version du manuscrit est présentée ici, telle que soumise et acceptée pour publication après les modifications effectuées suite aux commentaires des reviewers. Seules les numérotations des figures et tableaux ont été modifiées afin de s'intégrer au présent mémoire, et les tableaux détaillant les résultats de diversité génétique par locus adjoints à la publication comme matériels supplémentaires sont placés en annexe (Annexes 3 et 4). Cet article est le premier à explorer la structure génétique des populations d'*An. gambiae* s.l. au Niger, en dehors d'une étude récente (ESNAULT *et al.* 2008) ayant inclu des individus collectés à Banizoumbou et Zindarou dans le cadre d'un échantillonnage continental mené afin d'investiguer la différenciation génétique entre formes moléculaires M et S. De plus, la possibilité d'une modification de la composition génétique des populations anophéliennes suite à la mise en place de moustiquaires imprégnées a été peu étudiée, ayant fait l'objet d'une seule publication à notre connaissance (WONDJI *et al.* 2005b). Les co-auteurs extérieurs au CERMES ont été impliqués à différents niveaux de ce travail, depuis la rédaction du projet de recherche MODIPOP jusqu'à sa mise en œuvre sur les plates-formes de génotypage de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées à Marseille et de l'Institut Pasteur de Paris.

I. Population Structure of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Niger (Article 2)

Authors : Cyrille Czeher,*[,1] Rabiou Labbo,* Gaelle Vieville,* Ibrahim Arzika,* Hervé Bogreau,[†] Christophe Rogier,[†] Laure Diancourt,[‡] Sylvain Brisse,[‡] Frédéric Ariey[§] and Jean-Bernard Duchemin*

*Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES), Institut Pasteur International Network, Niamey, Niger

[†]Parasite Biology and Epidemiology Research Dept. & UMR 6236 - URMITE, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Ex-IMTSSA), Marseille, France

[‡]Institut Pasteur, Platform Genotyping of Pathogens and Public Health, Paris, France

[§]Institut Pasteur of Cambodia, Institut Pasteur International Network, Phnom Penh, Cambodia

Key-words : *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*, microsatellite, population structure, Niger

Résumé

Des millions de personnes sont protégées de l'infection palustre grâce à l'usage de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action. Les opérations de lutte contre le paludisme à grande échelle intégrant la distribution de telles moustiquaires devraient être accompagnées d'une évaluation de leurs effets et efficacité sur les paramètres épidémiologiques. Cette dernière pourrait être compromise par le développement de populations de vecteurs résistants aux insecticides, en raison d'une pression de sélection importante couvrant de vastes zones. Une distribution de moustiquaires imprégnées a été

menée sur l'ensemble du territoire nigérien en 2005. Nous avons étudié la structure génétique des populations de vecteurs majeurs du paludisme au niveau de la zone sahélienne du Niger, et les effets potentiels de cette vaste opération de contrôle du paludisme. Des femelles *Anopheles gambiae* sensu lato capturées dans sept villages pendant deux saisons des pluies consécutives ont été génotypées au niveau de douze marqueurs microsatellites. La diversité génétique observée au sein des deux espèces étudiées était similaire entre villages ainsi qu'entre années. La différenciation génétique estimée entre échantillons de la même espèce s'est avérée très faible, suggérant des flux géniques importants à l'intérieur de la zone d'étude. La plupart des comparaisons temporelles entre 2005 et 2006 ont également montré une absence de différenciation génétique, indiquant que la distribution de moustiquaires n'a pas modifié significativement la diversité et la structure génétique des populations de vecteurs dans la première année d'utilisation. Ces résultats participent à la documentation des effets de vastes programmes de contrôle du paludisme, qui permettra de mettre au point les futures interventions afin d'améliorer l'efficacité des outils disponibles.

Abstract

The increasing usage of long-lasting insecticide-treated nets allows protection of millions of people from malaria infection. Monitoring studies should be planned during any wide-scale malaria control programme integrating insecticide-treated materials, in order to evaluate their effects and effectiveness on epidemiologically relevant parameters. Such operational control interventions may be challenged by insecticide resistance spread within vector populations, due to wide insecticide pressure. A nationwide distribution of long-lasting insecticidal nets was implemented throughout Niger in 2005. We studied the population genetic structure of major malaria vectors across nigerien Sahel, and investigated potential effects of this large malaria control intervention. Wild-caught *Anopheles gambiae* sensu lato females from seven villages and two wet seasons were genotyped at twelve microsatellite loci. The genetic

diversity within both species appeared homogenous between villages and years. The estimated genetic differentiation among samples was very low within both species, indicating high gene flow across the area. An absence of differentiation was also found between 2005 and 2006 wet seasons, for all samples but one, showing that the net distribution did not impact significantly the genetic diversity and structure of vector populations in a single year. We provide valuable results participating to document effects of large malaria control programmes, in order to maximize the efficiency of available tools in future interventions.

I.1. Introduction

Decades of research efforts in malaria vectors biology, ecology, systematics and population genetics have led to a better understanding of *Plasmodium* transmission systems. Such knowledge is of prime importance to define adapted control solutions to the worldwide malaria burden. The *Anopheles gambiae* complex comprises at least seven distinct species (DAVIDSON 1964a; DAVIDSON and HUNT 1973; HUNT *et al.* 1998), including *An. gambiae* sensu stricto and *An. arabiensis*, the two main Afrotropical malaria vectors. Applying modern molecular biology methods, two molecular forms named M and S were described within *An. gambiae* based on fixed differences in X-linked rDNA sequences (DELLA TORRE *et al.* 2001; FAVIA *et al.* 1997), that are considered as incipient species. Some phenotypic variations were observed between M and S molecular forms (reviewed in LEHMANN and DIABATE 2008), with possible public health implications considering *Plasmodium* transmission systems increasing complexity.

The genetic structure of *An. gambiae* sensu lato (s.l.) populations was investigated mainly using nuclear microsatellite markers (ZHENG *et al.* 1996a), addressing phylogenetic, evolutionary, population biology and ecology issues. The later focus on intraspecific genetic variations in space and time, in order to identify population clustering, to estimate the degree of gene flow through migration and resulting deme size, or to get indications about seasonal population dynamics. Such studies help to better understand vectors population biology and genetics, with major implications concerning the prediction of resistance genes expansion and the feasibility of vector control using genetically modified mosquitoes. At the continental level, two main *An. gambiae* population groups were identified, separated by the Great Rift Valley which divides East and West Kenya and seems to act as a barrier to gene flow (KAMAU *et al.* 1999; LEHMANN *et al.* 1999; LEHMANN *et al.* 2003). However the Rift Valley did not appear to limit gene flow between *An. arabiensis* populations (KAMAU *et al.* 1999; NYANJOM *et al.* 2003). The other physical barriers to gene flow ever detected in sub-Saharan Africa were marine barriers isolating island populations from the continent (KAYONDO *et al.*

2005; MORENO *et al.* 2007; SIMARD *et al.* 1999). On a smaller scale (hundreds of kilometers), *An. gambiae* and *An. arabiensis* populations appear poorly structured, with variations depending upon the area under study.

The major malaria vectors in Niger belong to the *An. gambiae* complex, with other species like *An. funestus* involved more locally in the transmission (CZEHER *et al.* 2006; JULVEZ *et al.* 1998; LABBO *et al.* 2004). The molecular M form of *An. gambiae* and *An. arabiensis* are encountered abundantly over large areas during the transmission season, whereas the S form is only found in a few locations at low densities (unpublished data). The important latitudinal eco-climatic gradient occuring across Niger leads to a marked spatial heterogeneity in anopheline species distribution and density. Seasonal rain-dependent populations are found in southern Sudanian and Sahelian savannas, whereas the northern Saharan part of the country presents extremely rare populations due to restricted breeding opportunities (JULVEZ *et al.* 1992; JULVEZ *et al.* 1998).

A nationwide long-lasting insecticidal nets (LLIN) distribution targeting children under five years of age and pregnant women was implemented throughout Niger in 2005 (LOEWENBERG 2006). This operational programme, the first on such scale, provided a unique opportunity to evaluate the potential effect of LLINs on vector populations when spread over an extensive area. Several authors have studied potential modifications of *An. gambiae* populations following the use of insecticide-treated nets (ITNs), including changes in biting behavior, survival and density (DABIRE *et al.* 2006; GIMNIG *et al.* 2003a; HOSSAIN and CURTIS 1989; LINDBLADE *et al.* 2006; LINDSAY *et al.* 1989c; QUINONES *et al.* 2000), insecticide resistance (CORBEL *et al.* 2003; CZEHER *et al.* 2008; PROTOPOPOFF *et al.* 2008; STUMP *et al.* 2004) and entomological indices of *Plasmodium* infection (CARNEVALE *et al.* 1988; GIMNIG *et al.* 2003b; JAENSON *et al.* 1994; MAXWELL *et al.* 2003; PROTOPOPOFF *et al.* 2007). However one single study in north Cameroon (WONDJI *et al.* 2005b) investigated changes in the genetic composition and structure of vector populations following insecticide-treated nets distribution. This study is highly interesting but do not reflect operational programme conditions, with extensive treated areas but also partial coverage rates. We hypothesized that the national

ITNs coverage in Niger could have efficiently reduced *Anopheles* abundances across the treated zone, and that this population drop could have been sufficiently pronounced to cause a bottleneck, resulting in lower genetic diversity. The main objectives of this study were (1) to describe the genetic structure of *An. gambiae* complex members populations in the Sahelian zone of Niger, and (2) to evaluate the potential effects of the nationwide LLINs coverage on genetic diversity and structure estimators.

I.2. Materials and Methods

I.2.1. Study sites and mosquito collections

Within 14 Sahelian locations studied in the frame of the control programme monitoring, seven sites were selected for the purpose of this population genetics study (Figure 43). The sampling design followed a longitudinal transect, allowing to avoid potential effects of important ecological variations of the environment on mosquito population genetics. The geographical distance between sites ranged from 29 to 1,099 km, with two pairs of sites relatively close (29 km between Banizoumbou and Zindarou, 51 km between Maichilmi and Maikogo) whereas the three other sites (Garey, Fararatt, Damagaram Takaya) were chosen at distances higher than 108 km from the other closest site. The implementation of LLINs throughout the entire country precluded us to sample villages that did not receive nets from the campaign. In each village, adult mosquitoes were repeatedly sampled in the wet seasons of 2005 and 2006, respectively 3-5 months before and 7-9 months after the LLINs distribution. Collections were made during two consecutive nights, using indoor pyrethroids spraying, landing catches on human adult male volunteers and CDC light traps.

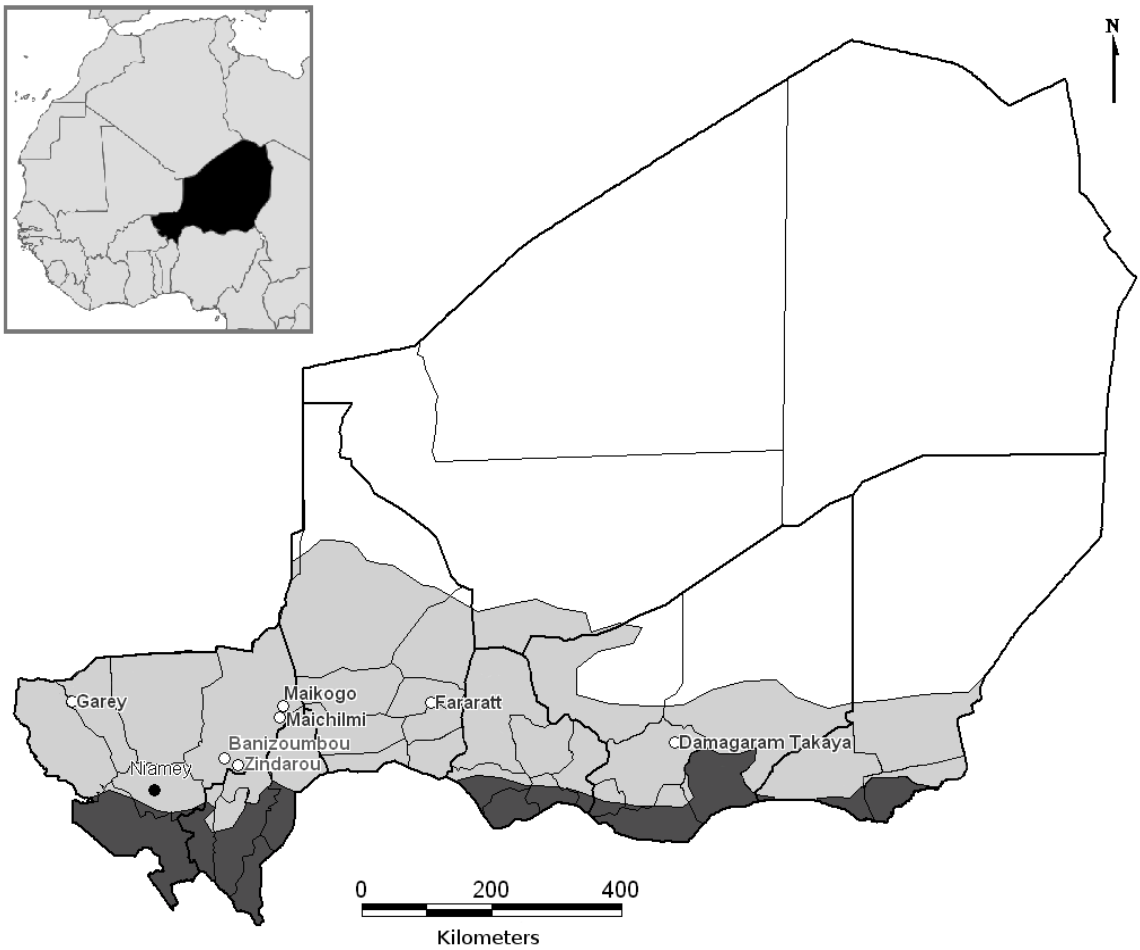


Figure 43. Carte du Niger indiquant les sites de capture (cercles blancs) et les zones éco-climatiques. La zone de savanne soudanienne est indiquée en gris foncé, la savanne sahélienne en gris clair, et les régions désertiques en blanc. Seul *An. gambiae* M a été étudié à Garey, tandis que seul *An. arabiensis* a été étudié à Damagaram Takaya. Les deux espèces ont été étudiées dans les cinq autres sites. La capitale, Niamey, est indiquée par un cercle noir.

I.2.2. LLIN distribution

The implementation of the programme was managed by the International Federation of the Red Cross and the National Malaria Control Programme of Niger. More than two million deltamethrin-treated LLINs (55 mg/m²) (Permanet® 2.0, Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland) were spread over 3,850 distribution points during the national poliomyelitis immunization campaign from december 2005. In accordance with strategic goals from the World Health Organization (WHO) and Roll Back Malaria (RBM) partnership (RBM 2005),

free LLINs distribution efforts were directed to populations that are most at risk of *Plasmodium* infection, *i.e.* children under five years of age and pregnant women. Most targeted populations were reached within one week, except in Niamey, the capital city, where the operation took place in March 2006.

I.2.3. DNA samples

After morphological identification of *An. gambiae* s.l. females using afrotropical *Anophelinae* identification keys (GILLIES and COETZEE 1987), a subset of each sample was selected for DNA extraction using Chelex-100 chelating resin (No. C7901, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A few legs of each female were ground with plastic pestles in 100 µl sterilized distilled water before adding 100 µl of a 20% Chelex-100 solution, while whole body was kept at -20° for *Plasmodium* transmission studies (in prep.). A first incubation step was done at 56° during 30 minutes, and a second at 95° during 10 minutes, with five seconds vortex pulses after each step. Finally, microtubes were centrifuged three minutes at 14,000 rpm, then supernatants were transfered into new sterile microtubes and conserved at -20° before PCR processing. DNA extracts were subjected to PCR-RFLP for the determination of species and molecular forms (SANTOLAMAZZA *et al.* 2004). Also, the recently described PCR method for the detection of the 2La paracentric inversion (WHITE *et al.* 2007) was used on subset of *An. gambiae* s.s. specimens.

I.2.4. Microsatellite markers

Twelve microsatellite loci with dinucleotide repeats were selected on the basis of physical and linkage maps (ZHENG *et al.* 1996b), previous studies that showed polymorphism (DONNELLY and TOWNSON 2000; KAYONDO *et al.* 2005; ONYABE and CONN 2001b; WANG *et al.* 1999; WONDJI *et al.* 2002), and preliminary tests for reliable amplification and polymorphism on both species samples from Niger. Eleven of these loci were used for both *An. gambiae* M form and *An. arabiensis*, with two on chromosome X (AgXH53, AgXH678),

five on chromosome 2 (Ag2H46, Ag2H197, Ag2H26, Ag2H523, Ag2H117) and four on chromosome 3 (Ag3H93, Ag3H555, Ag3H158, Ag3H577). One additional locus (AgXH99) was used for *An. gambiae* M form only as it was nearly monomorphic in *An. arabiensis* test sample. All loci were chosen outside known chromosomal inversions except Ag2H197 (2Rj/2Ra inversions), Ag2H26 (2Rb inversion) and Ag2H523 (2La inversion). For the amplification of locus Ag3H158, the alternative primers H158C/D designed by WANG *et al.* (1999) were used. All PCR reactions with fluorescent end-labeled primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were performed at CERMES (Niamey, Niger) on MasterCycler® (Eppendorf, Hamburg, Germany) or Primus 96 (MWG biotech, Milton Keynes, UK) thermal cyclers. Capillary electrophoresis were done at the Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Ex-IMTSSA, Marseille, France) on a 3130*xl* genetic analyzer (Applied Biosystems) using GeneScan™ 500(-250) LIZ® (Applied Biosystems) internal size standard for a first set of samples and loci (XH53, XH99, XH678, 2H46, 3H93 and 3H555). A second set was analyzed at the Platform Genotyping of Pathogens and Public Health (Institut Pasteur, Paris, France) on a 3730*xl* genetic analyzer (Applied Biosystems) with GeneFlo™ 625 (EURx, Gdansk, Poland) size standard, that allowed to analyse six other microsatellite markers (2H197, 2H26, 2H523, 2H117, 3H158 and 3H577) and additional specimens. All electrophoresis profiles were loaded in GENEMAPPER® software version 4.0 (Applied Biosystems) for allele size and class determination. Automatic peak detection and allele classification were performed, followed by visual verification of all detected peaks, adjustment of allele classes, and manual allele classification of missed or misclassified peaks. For six markers, some specimens were analyzed on the 3130*xl* whereas others were analyzed on the 3730*xl* analyzer. For these markers, a subset of 35 specimens (4% of all specimens) spanning most allele sizes was analyzed in both laboratories, followed by a careful adjustment and validation process to make both data sets comparable. For this purpose, exact allele sizes obtained in both laboratories were compared. Mean size differences over all tested specimens were comprised between 0.1 and 3.1 base pairs (bp), and were highly similar across the size range of each locus, with standard deviation values

comprised between 0.11 and 0.42 bp. These data were used to adjust allele classifications manually in GENEMAPPER®, taking the data obtained in Paris with the 3730*xl* as reference, which represent 77% of all single locus genotypes, therefore applying the adjustment on the other 23% of genotypes, for the six loci concerned. Once this calibration done, allelic and genotypic frequencies homogeneity were verified between both data sets, as an indication of its validity.

I.2.5. Data analyses

Text files exported from GENEMAPPER® were modified in order to be imported in GENETIX software version 4.05 (BELKHIR *et al.* 1996-2004). GENETIX was used (1) to calculate genetic diversity parameters (Allelic frequency, observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity under Hardy-Weinberg equilibrium (H_e)) for each locus in each sample, and (2) to convert the genotype data into FSTAT, GENEPOP and ARLEQUIN file formats. FSTAT version 2.9.4 (GOUDET 2003) was used to assess the number of alleles (N_{all}) and allelic richness (R_s) in each sample, and to test the statistical significance of R_s, H_o and F_{IS} variations between species and years using permutations of samples (comparison among groups of samples option, two-sided test with 5,000 permutations). Conformity of observed heterozygosities with Hardy-Weinberg (HW) equilibrium expectations and linkage disequilibrium between loci were investigated using exact tests from GENEPOP version 3.4, updated from version 1.2 (RAYMOND and ROUSSET 1995; ROUSSET 2008). MICRO-CHECKER software version 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004) was used to investigate potential causes of heterozygote deficit linked to the markers employed, especially genotyping problems due to null alleles and allele stuttering.

The spatial genetic structure of both species populations was assessed using three different methods. Firstly, genotypic homogeneity was studied qualitatively using G-based exact test (GOUDET *et al.* 1996) of genotypic differentiation between pairs of populations and amongst all populations available in GENEPOP (5,000 dememorizations, 500 batches, 5,000

randomizations). Secondly, FSTAT was used to estimate the level of differentiation between pairs of populations. The multilocus estimator of Wright's F_{ST} (WEIR and COCKERHAM 1984) was calculated, and statistical significance was determined by randomisation of multilocus genotypes between populations. We do not provide estimated numbers of migrants by generation (N_m) derived from F_{ST} values because their interpretation relies on too many underlying assumptions that could be violated considering *Anopheles gambiae* s.l. populations, particularly in marginal habitats (BOSSART and PASHLEY PROWELL 1998; DONNELLY *et al.* 2002). Thirdly, a bayesian based approach was used to estimate the most likeky number of population clusters, as implemented in STRUCTURE software version 2.3 (PRITCHARD *et al.* 2000). All analyses were run with 10^4 burnin period and 10^5 Markov Chain Monte Carlo repeats, using the admixture model and sampling location information, with default parameters. The temporal genetic differentiation between years 2005 and 2006 collections was evaluated using the same tools as for spatial structure analysis. In addition, analyses of molecular variance (AMOVA) were performed in ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.* 2005) to partition the genetic variation within villages, between villages within groups, and between groups, defined by year of collection, and to calculate fixation indices for the corresponding levels of subdivision, which statistical significance was tested using non-parametric permutation approach (EXCOFFIER *et al.* 1992). The sequential Bonferroni procedure (HOLM 1979) was applied when multiple tests were performed to adjust the level of significance and avoid type one errors.

I.3. Results

I.3.1. Vector sample sizes by site and subspecies

Too few *An. gambiae* S forms were found to be included in the analysis, whereas *An. gambiae* M form and *An. arabiensis* were sympatric in all villages. Only *An. gambiae* M forms

were further analyzed in Garey, and only *An. arabiensis* in Damagaram Takaya due to sample size requirements for population genetics studies. Samples sizes allowed us to analyze both species from the five other sites. However, it should be noted that Maichilmi and Maikogo samples (the two sites separated by 51 km) were mixed together for most analyses because 2006 wet season collections were small (9 and 17 *An. gambiae*, 8 and 7 *An. Arabiensis* specimens in Maichilmi and Maikogo, respectively) and could have biased the analyses. Sample sizes by village and year of collection were therefore comprised between 15 and 63 for *An. arabiensis* (mean 40.8 specimens/village/year), and between 26 and 112 for *An. gambiae* (mean 50.2 specimens/village/year).

I.3.2. Genetic diversity estimators

Multilocus genotypes were determined for 426 *An. arabiensis* specimens and 538 *An. gambiae* M form specimens collected in seven Sahelian villages in Niger during two consecutive wet seasons. The overall amplification and genotyping success among markers ranged from 82.2% to 96.3% for *An. gambiae* and from 86.2% to 97.9% for *An. arabiensis* samples (Tableau 8). These values were obtained after one genotyping attempt, and could not be enhanced by additional attempts due to logistical constraints. To limit the level of missing genotypes in the data set, every individual presenting missing data for at least four loci was excluded from the analysis. It represented 18 *An. arabiensis* and 36 *An. gambiae* specimens (4.2% and 6.7% of samples, respectively). All loci were highly polymorphic showing from nine to 24 alleles in *An. arabiensis* and from nine to 33 alleles in *An. gambiae*.

				An. arabiensis (n = 426)			*An. gambiae* (n = 538)		
Marker	Chr	position (cM)	Inversion	% pos	size range	Nall	% pos	size range	Nall
AGXH53	X	25,0	Xag	94,6	86-106	11	95,1	86-104	10
AGXH99	X	39,5	Xag	95,4	117-135	9	-	-	-
AGXH678	X	48,9	OI	96,3	148-164	9	93,0	148-170	12
AG2H46	2R	0,7	OI	85,5	132-156	13	86,6	132-154	12
AG2H197	2R	13,4	2Rj/2Ra	82,2	80-118	19	86,2	80-110	15
AG2H26	2R	34,1	2Rb	88,9	81-107	14	91,6	83-121	20
AG2H523	2L	55,2	2La	92,2	147-211	33	94,6	149-193	14
AG2H117	2L	65,1	OI	90,9	85-111	13	97,9	85-107	10
AG3H93	3R	0,0	OI	93,5	144-186	22	92,5	140-190	24
AG3H555	3R	37,1	OI	94,6	77-131	25	97,4	79-131	21
AG3H158CD	3R	46,8	OI	92,6	85-111	14	93,4	87-105	9
AG3H577	3L	71,9	OI	89,2	81-121	20	93,2	81-125	22

Tableau 8. Caractéristiques des marqueurs microsatellites utilisés: localisation chromosomique, pourcentage d'échantillons correctement génotypés (% pos), échelle de taille des fragments amplifiés (size range), et nombre d'allèles distincts trouvés (Nall). Les données présentées pour chaque espèce correspondent à l'échantillons total tous sites et années confondus. Chr, chromosome, cM, centiMorgan. OI. outside inversion. L'absence de données est indiquée par un tiret.

Mean allelic richness (R_s) values ranged from 6.35 to 7.82 for *An. arabiensis* and from 7.95 to 9.05 for *An. gambiae* samples. Mean observed heterozygosity (H_o) across all loci ranged from 0.528 to 0.584 in *An. arabiensis* and from 0.633 to 0.673 in *An. gambiae* samples (Tableau 9). For both species, neither R_s nor H_o values did differ significantly between sites and years (FSTAT comparison among groups, $p >> 0.05$). However, defining two groups according to the longitudinal position of collection sites, western *An. arabiensis* samples (Banizoumbou and Zindarou) presented a significantly higher allelic richness value than eastern samples (Fararatt and Damagaram) ($p = 0.0419$), but no difference in H_o. Both diversity indicators did not follow such trend in *An. gambiae* samples. In addition, when comparing *An. arabiensis* and *An. gambiae* samples with the same method, genetic diversity estimators R_s and H_o appeared significantly higher in the *An. gambiae* samples group ($p = 0.0002$ for both R_s and H_o).

		Populations														
		2005 - Before LLINs						2006 - After LLINs								
		Garey	Bani	Zind	Maich	Fara	Dama	Garey	Bani	Zind	Maich	Fara	Dama	All 2005	All 2006	All
An. arabiensis	2n	-	54	86	126	62	66	-	104	92	30	108	88	394	422	816
Mean over 11loci																
	*R*s	-	7,82	7,16	7,33	7,53	6,35	-	7,33	7,55	-	6,63	6,45	7,24	6,99	7,13
	*H*o	-	0,551	0,528	0,576	0,546	0,535	-	0,584	0,575	0,579	0,576	0,532	0,542	0,568	0,560
	*H*e	-	0,671	0,640	0,649	0,680	0,602	-	0,651	0,673	0,666	0,637	0,617	0,634	0,650	0,650
	*F*is	-	0,182	0,177	0,114	0,199	0,112	-	0,104	0,148	0,134	0,096	0,139	0,155	0,125	0,139
Mean over 9 loci																
	*R*s	-	8,13	7,33	7,31	7,49	6,33	-	7,41	7,65	-	6,74	6,47	7,32	7,07	7,21
	*H*o	-	0,572	0,543	0,591	0,572	0,524	-	0,589	0,585	0,585	0,614	0,546	0,564	0,585	0,575
	*H*e	-	0,668	0,611	0,634	0,676	0,586	-	0,632	0,656	0,656	0,625	0,597	0,635	0,634	0,634
	*F*is	-	0,146	0,113	0,068	0,156	0,108	-	0,068	0,109	0,112	0,017	0,086	0,113	0,077	0,094
An. gambiae M	2n	92	104	78	224	98	-	68	86	94	52	108	-	596	408	1004
Mean over 12loci																
	*R*s	8,00	8,09	8,42	8,23	8,71	-	7,95	8,58	9,05	8,54	8,38	-	8,29	8,50	8,39
	*H*o	0,644	0,633	0,665	0,666	0,665	-	0,645	0,661	0,673	0,661	0,654	-	0,657	0,658	0,658
	*H*e	0,740	0,745	0,744	0,740	0,753	-	0,745	0,762	0,765	0,754	0,734	-	0,745	0,753	0,748
	*F*is	0,131	0,152	0,108	0,100	0,118	-	0,136	0,134	0,121	0,126	0,110	-	0,117	0,125	0,121
Mean over 10 loci																
	*R*s	7,75	8,01	8,20	8,08	8,63	-	7,84	8,60	9,03	8,38	8,33	-	8,13	8,44	8,28
	*H*o	0,657	0,658	0,672	0,681	0,684	-	0,627	0,681	0,677	0,645	0,682	-	0,674	0,667	0,671
	*H*e	0,719	0,734	0,726	0,725	0,739	-	0,730	0,746	0,748	0,737	0,722	-	0,729	0,737	0,732
	*F*is	0,088	0,104	0,075	0,060	0,075	-	0,143	0,088	0,096	0,128	0,057	-	0,076	0,095	0,084

Tableau 9. Richesse allélique (*R*s), hétérozygotie observée (*H*o), hétérozygotie attendue d'après HW (*H*e), et indice *F*is des échantillons étudiés. 2n, nombre de chromosomes génotypés. Bani, Banizoumbou. Zind, Zindarou. Maich, Maichilmi et Maikogo (confondus). Fara, Fararatt. Dama, Damagaram Takaya. L'absence de données est indiquée par un tiret. La moyenne sur 9 loci inclut XH53, XH678, 2H197, 2H26, 2H523, 2H117, 3H93, 3H555 and 3H577. La moyenne sur 10 loci inclut ces 9 loci et XH99.

I.3.3. Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium

For *An. arabiensis*, 10/55 (18.2%) and 7/55 (12.7%) of all single-locus tests gave significant heterozygote deficit in 2005 and 2006, respectively (Annexe 3). For *An. gambiae*, 12/60 (20.0%) and 8/60 (13.3%) of all tests gave significant heterozygote deficit in 2005 and 2006, respectively (Annexe 4). In both species, more than half of the departures from HW equilibrium were detected in loci Ag2H46 and Ag3H158 (12/17 significant tests for *An. arabiensis* and 13/20 for *An. gambiae*). MICRO-CHECKER software detected a probability of null alleles presence especially in these two loci. Indeed, all *An. gambiae* M form samples were suggested to present null alleles for both loci at frequency ranging from 9.3 to 25.1%, whereas all *An. arabiensis* samples but one presented a null allele signature for the same loci, with estimated null allele frequency from 8.2 to 44.1%. Some allele stuttering was also

suggested by MICRO-CHECKER analyses for these two loci. This phenomenon could potentially lead to the misidentification of heterozygotes therefore classified as homozygotes, especially with a difference of one repeat unit between alleles and multimodal peak profiles. However, given the profile of Ag2H46 and Ag3H158 generally presenting a clear monomodal peak, the observed heterozygote deficits are probably rather due to null alleles. These two loci were therefore excluded from differentiation calculations. Only one pair of loci was in linkage disequilibrium in *An. arabiensis* (pair Ag2H523-Ag2H26) in only one collection (Damagaram in 2005). A similar result was observed for *An. gambiae*, with the pair AgXH678-Ag2H523 in the sample from Fararatt collected in 2005. This global lack of linkage between loci also suggests that the observed deviations from HW proportions are due to locus-specific effects and that the studied populations could be considered at HW equilibrium.

I.3.4. Spatial genetic structure

Exact tests of genotypic differentiation gave indication of shallow population structure for both *An. gambiae* M and *An. arabiensis*. When both years collections were analyzed separately, most pairwise computations over all loci gave non significant p-values (Tableau 10). All 20 *An. gambiae* comparisons showed genotypic homogeneity whereas five pairwise comparisons showed significant differentiation for *An. arabiensis* (two in 2005, three in 2006). When the same test was computed among all samples, *An. arabiensis* presented a significant differentiation in 2005 but not in 2006, whereas *An. gambiae* showed spatial homogeneity for both years (data not shown). However, the differentiation detected over all loci for *An. arabiensis* pooled sample from 2005 was due to only three significant single locus p-values (Loci XH53, XH678 and 3H577).

The estimation of the degree of genetic differentiation between sampling locations using F_{ST} indices also supports the homogeneity among samples from both species. All pairwise comparisons gave non significant F_{ST} values for *An. gambiae* samples either from 2005 (F_{ST}

≤ 0.0040) or 2006 (F_{ST} ≤ 0.0033) (Tableau 10). Similarly, *An. arabiensis* samples presented low and unsignificant F_{ST} values in 2005 (F_{ST} ≤ 0.0119), but slightly higher F_{ST} values and 2/10 significant comparisons for 2006 samples (F_{ST} ≤ 0.0238). However, the four highest F_{ST} values (F_{ST} = 0.0176-0.0238 ; 2/4 significant comparisons) involved the Maichilmi-Maikogo mixed sample composed by only 15 *An. arabiensis* individuals, whereas comparisons between other sites gave lower and non significant F_{ST} values (F_{ST} ≤ 0.0128). As no spatial genetic structuring was found either for *An. gambiae* M or *An. arabiensis*, no isolation-by-distance analysis was done. In addition, pairwise comparisons between sympatric *An. arabiensis* and *An. gambiae* M samples showed highly significant differentiation (F_{ST} = 0.1108-0.1850) (Tableau 10).

			An. gambiae				*An. arabiensis*				
Year	species	site	Bani	Zind	Maich	Fara	Bani	Zind	Maich	Fara	Dama
2005	*An. gambiae*	Garey	-0.0018	0.0040	-0.0006	-0.0012	**0.1627** *	**0.1954** *	**0.1810** *	**0.1262** *	**0.2017** *
		Bani		0.0026	0.0023	0.0011	**0.1472** *	**0.1749** *	**0.1608** *	**0.1093** *	**0.1787** *
		Zind			0.0014	0.0024	**0.1576** *	**0.1850** *	**0.1718** *	**0.1152** *	**0.1889** *
		Maich				0.0012	**0.1589** *	**0.1848** *	**0.1732** *	**0.1213** *	**0.1914** *
		Fara					**0.1483** *	**0.1796** *	**0.1642** *	**0.1108** *	**0.1843** *
	An. arabiensis	Bani						-0.0004	0.0048	0.0109	0.0091
		Zind							0.0017	0.0123	0.0003
		Maich								0.0019	0.0007
		Fara									0.0092
2006	*An. gambiae*	Garey	0.0005	0.0001	0.0032	-0.0019	**0.1822** *	**0.1652** *	**0.1321** *	**0.1801** *	**0.1964** *
		Bani		-0.0023	0.0033	0.0004	**0.1435** *	**0.1262** *	**0.1075** *	**0.1402** *	**0.1546** *
		Zind			0.0013	-0.0015	**0.1577** *	**0.1403** *	**0.1231** *	**0.1540** *	**0.1697** *
		Maich				0.0010	**0.1706** *	**0.1511** *	**0.1369** *	**0.1669** *	**0.1846** *
		Fara					**0.1799** *	**0.1621** *	**0.1410** *	**0.1734** *	**0.1902** *
	An. arabiensis	Bani						-0.0025	0.0238	0.0025	0.0035
		Zind							0.0228	0.0055	0.0128
		Maich								0.0176 *	0.0216 *
		Fara									0.0022

Tableau 10. Différenciation génotypique (F_{ST}) intra- et inter-espèces des échantillons collectés en 2005 et 2006. Bani, Banizoumbou. Zind, Zindarou. Maich, Maichilmi et Maikogo (confondus). Fara, Fararatt. Dama, Damagaram Takaya. Les comparaisons significatives par le test exact de différenciation génotypique (qualitatif) sont soulignées. Les comparaisons entre *An. arabiensis* et *An. gambiae* sont indiquées en gras. Les indices F_{ST} significatifs sont indiqués par une astérisque. Ces données ont été obtenues par l'analyse de 9 loci (XH53, XH678, 2H197, 2H26, 2H523, 2H117, 3H93, 3H555, 3H577).

I.3.5. Temporal genetic structure

The exact test of genotypic differentiation was computed between 2005 and 2006 samples from each species and village. Only two single-locus tests gave significant p-values after correction for multiple tests, both for *An. arabiensis* samples and loci located on chromosome X (Tableau 11). Tests over all loci gave unsignificant p-values for all comparisons except for the *An. arabiensis* sample from Fararatt (p = 0.0021). Accordingly, F_{ST} estimates among temporal samples from each village were very low ($F_{ST} \leq 0.0024$ for *An. gambiae*, $F_{ST} \leq 0.0081$ for *An. arabiensis*) and non significant.

	Locus	Garey	Bani	Zind	Fara	Dama
An. arabiensis	XH53	-	0.0511	0.0243	-0.0016	-0.0024
	XH678	-	-0.0117	0.0157	0.0403	0.0004
	3H93	-	-0.0065	-0.0030	0.0201	-0.0018
	3H555	-	-0.0061	0.0158	-0.0063	-0.0024
	3H577	-	-0.0052	0.0141	-0.0028	0.0052
	2H197	-	-0.0146	0.0009	0.0032	-0.0032
	2H523	-	-0.0058	0.0018	0.0107	0.0235
	2H26	-	0.0103	-0.0003	-0.0036	-0.0003
	2H117	-	0.0078	-0.0002	-0.0094	0.0082
	All	-	0.0025	0.0081	0.0062	0.0031
An. gambiae	XH53	0.0005	-0.0083	-0.0106	-0.0063	-
	XH99	-0.0041	-0.0102	0.0113	-0.0087	-
	XH678	-0.0023	-0.0067	-0.0043	0.0175	-
	3H93	0.0112	-0.0071	0.0014	-0.0047	-
	3H555	-0.0047	0.0052	0.0261	-0.0040	-
	3H577	-0.0001	0.0141	0.0033	0.0002	-
	2H197	-0.0054	0.0063	-0.0071	-0.0025	-
	2H523	-0.0023	-0.0009	-0.0044	-0.0038	-
	2H26	-0.0056	0.0010	0.0112	-0.0036	-
	2H117	0.0022	-0.0069	-0.0072	0.0100	-
	All	-0.0010	-0.0013	0.0024	-0.0015	-

Tableau 11. Différenciation génotypique et indices F_{ST} temporels, par comparaison des échantillons collectés en 2005 et 2006. gamb M, *An. gambiae* M form. arab, *An. arabiensis*. L'absence de données est indiquée par un tiret. Les differenciations génotypiques significatives par le test exact qualitatif sont soulignées. Aucune valeur de F_{ST} n'a en revanche été significative.

I.3.6. AMOVA and bayesian-based cluster analyses

For both species, AMOVA computed with two groups defined by year of collection showed that almost all the allele frequencies variance was found within villages (99.44% for *An. arabiensis* and 99.83% for *An. gambiae*), whereas "within years between villages" and "between years" components explained only minor parts of the total variance. The effect of year of collection was not significant for both species (df = 1, $p >> 0.05$). The effect of sites within years was significant for *An. arabiensis* samples (df = 8, $p = 0.0004$), although it explained only 0.66% of variation, but not for *An. gambiae* (df = 8, $p = 0.2321$).

The bayesian-based analysis performed with STRUCTURE on the whole data set clearly separated the two species *An. arabiensis* and *An. gambiae* M in two distinct clusters (Figure 44). No additional clustering was detected within species, again suggesting genetic homogeneity between villages and also between the two collection years. A few specimens (12 *An. arabiensis* and 6 *An. gambiae*) from most samples showed a high probability to belong to the opposite cluster. For example, within the sample from Banizoumbou molecularly identified as *An. arabiensis*, three specimens were genetically closer to the *An. gambiae* cluster, with assignement probabilities of 73, 88 and 94%. Even if we cannot exclude errors in species molecular identification or microsatellite genotyping, these atypical genotypes could perhaps result from introgressive hybridation between *An. gambiae* and *An. arabiensis* specimens. Although *An.gambiae-An. arabiensis* hybrids were not identified using rDNA IGS sequence during this study, this hypothesis is consistent with the observed presence of one to few atypical genotypes in sympatric sites only.

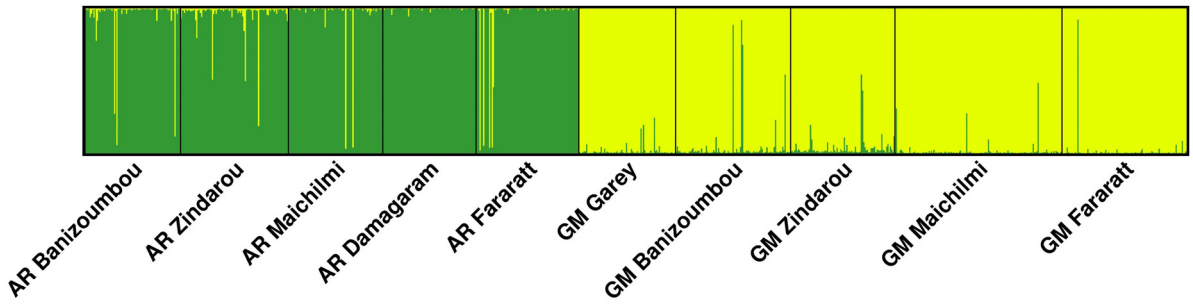


Figure 44. Résultats de l'analyse bayesienne de clusters pour l'ensemble des échantillons et le nombre de clusters le plus probable (K = 2). Les espèces et sites sont indiqués en dessous des échantillons, délimités par des lignes verticales noires. Chaque individu est représenté par une fine bande verticale, dont les couleurs représentent la probabilité d'assignement à l'un ou l'autre des clusters. Le cluster suggéré correspondant à An. arabiensis est représenté en vert, l'autre cluster correspondant à An. gambiae en jaune. AR, *An. arabiensis*. GM, *An. gambiae* M.

I.4. Discussion

We studied *An. gambiae* M form and *An. arabiensis* populations from the Sahel zone of Niger, in which they are largely sympatric. The clustering of heterozygotes deficit at loci Ag2H46 and Ag3H158 found in both species probably results from locus-specific effects such as null alleles occurence, rather than subdivision of the gene pools or inbreeding. Significant heterozygotes deficits due to null allele occurence were repeatedly noticed for these loci in previous studies of *An. gambiae* (CHEN *et al.* 2004; LANZARO *et al.* 1998; PRUGNOLLE *et al.* 2008) and *An. arabiensis* (NYANJOM *et al.* 2003; TEMU and YAN 2005) populations. This phenomenon could also be the cause of the HW departures observed at these loci in our data set. Within each species, populations were strikingly homogenous in terms of genetic diversity and structure across the study area. This absence of differentiation between populations separated by up to 880 km for *An. arabiensis* and 540 km for *An. gambiae* may be explained by high gene flow, possibly resulting from important dispersion of adults within the study area. Although the average flight range of *An. gambiae* s.l. females is

commonly thought to be restricted to few kilometers based on mark-release-recapture studies (COSTANTINI *et al.* 1996; THOMSON *et al.* 1995; TOURE *et al.* 1998a), movements of adults mosquitoes, either passively through human transportations or in active wind-assisted flights, could be hypothesized (SERVICE 1997).

Concerning *An. gambiae*, our results are in accordance with those from neighboring countries. *An. gambiae* M populations from Nigeria (ONYABE *et al.* 2003) gave low F_{ST} values excluding loci within chromosome 2 inversions, indicating high gene flow even across large distances and different ecological zones. Also, a recent study of *An. gambiae* M form populations from Mali (SLOTMAN *et al.* 2007) showed extensive genetic homogeneity across comparable distances, with some sites ecologically close to the Sahelian villages from our study. Less data are available for *An. arabiensis* west african populations. A study conducted in Nigeria (ONYABE and CONN 2001b) showed significant differentiation both within and between ecological zones, thought F_{ST} values for between zones comparisons were far greater. These results suggesting low gene flow contrast with the data presented here. However the differentiation between the two Sudan savanna locations in Nigeria (Sokoto and Garki, F_{ST} = 0.016) is comparable to the significant values we found in Sahel savanna of Niger. Also, in accordance with our results, no differentiation was found between two *An. arabiensis* samples from Mali and north Cameroon despite a 1,780 km distance (SLOTMAN *et al.* 2007).

Among other factors, demographic history can influence genetic structure (BESANSKY *et al.* 1997; LEHMANN *et al.* 1996). Indeed, it was suggested that past *An. gambiae* population expansion probably associated with either the expansion of human populations in Africa, the development of agriculture, and/or Pleistocene climate changes (COLUZZI *et al.* 2002; DONNELLY *et al.* 2001; LEHMANN *et al.* 2003; MATTHEWS *et al.* 2007) could explain the extensive genetic homogeneity observed among some populations using microsatellites or mtDNA sequencing. In particular, MATTHEWS *et al.* (2007) recently confirmed the expansion of *An. arabiensis* populations within Nigeria, which had been suggested earlier (ONYABE and CONN 2001b), and observed a stronger expansion signature in northern localities. These

sites are situated in the Sudan savanna zone, near the south border of Niger and not far from our sampling sites. Such demographic instability could perhaps explain, at least partly, the absence of spatial structuring we observed in Niger. Environmental conditions also play a major role in shaping *An. gambiae* s.l. populations structure, as shown by the observed relation between chromosomal inversions frequencies and the degree of aridity in West Africa, likely due to adaptative values conferred by certain karyotypes (COLUZZI *et al.* 1979). Consequently, marked variations in the degree of spatial structuring were described between loci located inside and outside polymorphic inversions for *An. gambiae* (ONYABE *et al.* 2003) and *An. arabiensis* (TEMU and YAN 2005), likely due to the hitchhiking of loci inside inversions with close genes under selection. However, in our data set, loci inside inversions were not linked to different genetic differentiation patterns. In addition, molecular karyotyping of a subset of *An. gambiae* M forms (n = 73) indicated the probable near fixation of 2La inversion in the study area. Alternatively, methodological issues like the choice of markers or the number of specimens analyzed could not have been able to capture the whole genetic variability due to a lack of resolution or power, that would have explained the observed homogeneity among samples. This hypothesis is quite unlikely, as (1) the set of markers presented a sufficient polymorphism level to allow a clear differentiation of all *An. gambiae* versus *An. arabiensis* comparisons, (2) most markers were already used successfully in unravelling intraspecific spatial differentiation patterns (DONNELLY and TOWNSON 2000; ONYABE and CONN 2001b; YAWSON *et al.* 2007), and (3) samples sizes were similar to previously published studies.

The temporal stability of genetic diversity estimators and allellic frequencies between 2005 and 2006 samples tends to show that both species populations did not experience much genetic drift during the year, and that the extremely low number of specimens sampled in the dry season is compatible with the persistence of many individuals in or around villages until the onset of rainfalls. These findings are consistent with previous studies of seasonal *An. arabiensis* (KENT *et al.* 2007; SIMARD *et al.* 2000; TAYLOR *et al.* 1993) and *An. gambiae*

(KAYONDO *et al.* 2005; LEHMANN *et al.* 1998) populations. The nationwide LLIN distribution organized in the end of 2005 did not impact significantly the genetic diversity and structure of *An. gambiae* and *An. arabiensis* populations from Niger in a single year. To date, the only comparable study involved *An. arabiensis* population from one sole village in northern Cameroon (WONDJI *et al.* 2005b) where ITNs were provided. Only a minor and transient impact on vector genetic structure was observed, probably due to the number of survival mosquitoes and/or to the limited size of the treated area, that made mosquito immigration from surrounding zones probable. In the present study, the situation was highly different as the nets implementation reached the whole country area. Our hypothesis was this scale-up would have a mass effect on vector population reduction and would cause sharp changes in their genetic composition. We clearly did not observe such effect. Targeting vulnerable human populations combined with uncomplete coverage rate of these groups could have resulted in too limited LLIN coverage at the community level, without clear decrease in mosquito populations to result in detectable effects. Nevertheless, the campaign greatly increased ITN ownership and usage among nigerien populations, especially in target populations, even if RBM objective of covering 80% populations at risk of malaria were not reached (RBM 2005). The national rate of ITN ownership for all households was 6.3% before the campaign and increased to 65.1% in the rainy season following the campaign, whereas ITN usage rates in vulnerable groups reached 55.5% for children under five years and 48.2% for pregnant women (THWING *et al.* 2008). Several modifications of vector populations were observed in the following transmission season. Indeed, the monitoring of 12 Sahelian villages (comprising those studied here) showed a global decrease of vector abundances between 2005 and 2006 (unpublished data). Also, the frequency of the Leu-Phe knockdown resistance (*kdr*) mutation increased in *An. gambiae* M form samples from the same villages (CZEHER *et al.* 2008), probably due to a selection effect exerted by the nationwide LLIN coverage. Altogether, these results suggest that malaria vector populations were impacted by the campaign, but were not genetically depauperated in the following year. It should finally be noted that the absence of mass killing showed by temporal genetic stability do not imply

that the program did not reduce malaria transmission. The nets could for example have repelled many blood-seeking females, therefore diverted to other blood sources outside houses, without reduction of genetic diversity.

We described the genetic structure of *An. gambiae* and *An. arabiensis* from nigerien Sahel, and investigated potential variations due to the nationwide LLIN distribution from 2005. These data are important in the effort to better characterize malaria vectors populations throughout Africa, and to document effects of large-scale control programmes such as ITN distributions on vector, parasite, and human populations. Indeed, apart from the specific goals of this article, it is of prime importance to evaluate which control measures will efficiently decrease *Plasmodium* transmission intensity and associated morbidity and mortality in different eco-epidemiological situations. Apart from early diagnostic and treatment, pyrethroid-treated nets constitute the principal weapon against malaria. As scaling-up LLIN full coverage throughout sub-Saharan Africa is advocated, the risk of pyrethroid resistance spread in vector populations is of great concern. This is particularly true as pyrethroids are to date the only insecticide class available for nets impregnation. In the case of Niger, the important increase of *kdr* mutation frequency after the campaign, coupled to the high spatial gene flow described here, could in the near future result in extensive resistant populations and efficacy loss of last generation LLINs. It is therefore crucial that the monitoring of vector populations could be maintained on a regular basis, and that efficient alternative solutions for impregnating nets are made available.

Acknowledgements

We are grateful to all people from the CERMES parasitology unit in Niger, the Institut Pasteur of Paris, the Institut Pasteur of Cambodia and the Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Ex-IMTSSA, Marseille, France) who participated to this work. This research received financial support from the Fonds dédié “Combattre les maladies parasitaires” (Sanofi-Aventis/Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche). Field work and CC's doctoral fellowship were funded by the IVth round of the Global Fund to fight AIDS, Tuberculosis and Malaria attributed to Niger through the International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies, except for Banizoumbou and Zindarou villages, where field work was funded by the European Union through African Monsoon Multidisciplinary Analyses (AMMA) project (reference CS 4089). Based on a French initiative, AMMA was built by an international scientific group and is currently funded by a large number of agencies, especially from France, UK, US and Africa. It has been the beneficiary of a major financial contribution from the European Community's Sixth Framework Research Programme. Detailed information on scientific coordination and funding is available on the AMMA International web site : http://www.amma-international.org. The Platform Genotyping of Pathogens and Public Health (Paris, France) is supported by the Institut Pasteur and the Institut de Veille Sanitaire (Saint-Maurice, France).

II. Données complémentaires

Les spécimens génotypés et inclus dans l'étude de génétique des populations ont été collectés à l'aide de plusieurs méthodes. Les effectifs des échantillons de chaque site et année sont détaillés par méthode et lieu (intérieur/extérieur) de capture dans le tableau 12. Les faibles effectifs collectés dans plusieurs villages, principalement en 2006, nous ont contraint à analyser l'ensemble des individus, quelque fut leur méthode de capture. La proportion d'individus collectés par les différentes méthodes ayant donc varié selon les échantillons, nous avons cherché à estimer l'influence de l'échantillonnage sur les résultats obtenus.

			Intérieur			Extérieur
Espèce	Année	Site	Atterrissage	Repos	Pièges	Atterrissage
An. arabiensis	2005	Banizoumbou	2	23		2
		Zindarou	19	11	11	2
		Maichilmi	8	9		20
		Maikogo	14	7		5
		Damagaram	6	11	5	7
		Fararatt	13	10	1	7
	2006	Banizoumbou	9	41		2
		Zindarou	13	5	19	9
		Maichilmi	3	4	1	
		Maikogo	1	2	2	2
		Damagaram	10	26		8
		Fararatt	15	30	4	5
	total		113	179	43	69
An. gambiae	2005	Garey	25	19		2
		Banizoumbou	4	43	2	3
		Zindarou	11	7	14	7
		Maichilmi	20	12		25
		Maikogo	30	14		11
		Fararatt	21	16	2	10
	2006	Garey	7	22	2	3
		Banizoumbou	11	28		4
		Zindarou	29	3	7	7
		Maichilmi	1	4	3	1
		Maikogo	7	6	1	3
		Fararatt	15	33	2	4
	total		181	207	33	80

Tableau 12. Détails des effectifs analysés pour l'étude de génétique des populations, par méthode et lieu de capture (Capture à l'atterrissage sur sujet humain à l'intérieur/extérieur, capture de la faune au repos dans les habitations, pièges lumineux de type CDC).

Face aux F_{IS} globaux positifs observés dans la plupart des échantillons (Tableau 9) témoignant de déficits en hétérozygotes à l'intérieur des villages (y compris après avoir retiré les deux loci suspectés de présenter des allèles nuls), l'hypothèse d'une subdivision génétique a été envisagée entre sous-échantillons de méthode et/ou lieu de collecte différents. En pratique, certains sous-échantillons étaient trop petits et n'ont pas été analysés, notamment correspondant aux pièges lumineux, et certaines captures à l'atterrissage à l'extérieur des maisons. Les valeurs de F_{IS} obtenues ont été très comparables à celles des échantillons toutes méthodes de collecte confondues (Tableau 13), suggérant l'absence de subdivision liée aux plan d'échantillonnage, confortée par l'absence de différentiation génotypique entre ces mêmes sous-échantillons (F_{ST} faibles et non significatifs).

	An. gambiae M				*An. arabiensis*			
Sites	All	LC ext	LC int	Repos	All	LC ext	LC int	Repos
Garey	0,107	-	0,104	0,143	-	-	-	-
Banizoumbou	0,095	-	0,164	0,131	0,104	-	0,065	0,107
Zindarou	0,093	0,125	0,116	0,119	0,107	0,005	0,214	0,074
Maichilmi/Maikogo	0,073	0,075	0,086	0,127	0,110	0,036	0,117	0,062
Fararatt	0,065	0,083	0,138	0,102	0,073	0,113	0,075	0,109
Damagaram Takaya	-	-	-	-	0,103	0,054	0,115	0,045

Tableau 13. F_{IS} des sous-échantillons d'*An. gambiae* M et *An. arabiensis* par méthode de capture, tous loci (sans 2H46 et 3H158) et années confondues. All; toutes méthodes. LC ext; atterrissage externe. LC int; atterrissage interne.

Soulevée par l'observation de l'homogénéité génétique des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* sur des distances de plusieurs centaines de kilomètres, la question de leurs capacités de dispersion est importante et mérite d'être développée. Des mouvements d'individus sur de longues distances peuvent être supposés, mais sont difficiles à démontrer. Ils pourraient se produire passivement par le biais des moyens de transport humains, et/ou

activement à l'occasion de vols assistés par les vents (SERVICE 1997). Un certain nombre d'observations ont suggéré la survenue de tels évènements chez différentes espèces culicidiennes. Ainsi, des phénomènes d'immigration rare mais massive d'*An. pharoensis* ont été rapportés en Israel et à Gaza (GARRET-JONES 1962), probablement à partir de gîtes larvaires de la région du delta du Nil en Egypte. Ce type de vols a également été supposé chez *An. squamosus* en Tanzanie (WHITE 1970b), et *Culex annulirostris* entre la Papouasie-Nouvelle-Guinée et l'Australie (RITCHIE and ROCHESTER 2001), impliquant des déplacements de plusieurs centaines de kilomètres. De tels mouvements de populations sont probablement peu fréquents, nécessitant notamment des conditions météorologiques particulières, mais pourraient participer à l'homogénéisation génétique au sein de l'aire de distribution des espèces et à la diffusion de gènes pouvant conférer un avantage sélectif, à condition que la zone d'immigration présente des conditions favorables à leur maintien. Concernant *An. gambiae*, cette possibilité est difficile à concilier avec les estimations de ses capacités de vol. Cependant, deux types de vols pourraient être distingués : (1) des vols réguliers sur des petites distances, typiquement liés à la recherche d'une source de sang, d'un gîte de repos ou d'oviposition, et (2) des vols peu fréquents sur de longues distances, aidés par les mouvements de masses d'air atmosphériques (SERVICE 1997). De plus Il est à noter que les études par marquage-recapture présentent un certain nombre de limitations, notamment du fait de la lourdeur du dispositif expérimental, uniquement viable à échelle spatiale réduite, ainsi que de la difficulté de mettre en évidence des évènements rares. Cette technique est donc adaptée à l'étude des mouvements réguliers à petite échelle, au niveau du village voire entre villages proches, mais entraîne probablement une sous-estimation des capacités de dispersion des moustiques (SERVICE 1997; SIMARD *et al.* 2000).

Parmis les facteurs envisagés dans l'article, les conditions environnementales ont une influence majeure sur la structure génétique des populations d'*An. gambiae* s.l., conditionnant leur distribution dans l'espace et le temps, influançant leurs déplacements et modelant l'hétérogénéité génétique des populations, d'abord mise en évidence par l'étude

des inversions chromosomiques. La dynamique des populations de vecteurs au cours de l'année résulte également des conditions éco-climatiques, pouvant permettre le maintien de grandes populations stables toute l'année, jusqu'à des populations extrèmement fluctuantes détectables uniquement lors de la saison pluvieuse favorable à leur développement. L'impact de ces variations sur la composition génétique des populations est mal connu, mais il est envisageable que des variations écologiques favorisent par ce biais la differenciation génétique, tandis que les flux géniques au sein d'une région écologiquement similaire seraient favorisés. Ainsi, l'absence de structuration génétique rapportée ici pourrait être en partie liée à la situation éco-climatique des villages échantillonnés, tous situés dans la zone sahélienne. Il est cependant important de noter que, si cette dernière est définie par le régime de pluies et le type de végétation, elle présente une grande variabilité environnementale localement (LEBEL *et al.* 2003), pouvant expliquer l'observation de différentes dynamiques de populations de moustiques entre villages. L'étude des populations d'*An. gambiae* s.l. à Banizoumbou et Zindarou, villages distants de quelques dizaines de kilomètres en constitue un bon exemple (voir Chapitre 2 partie II.1.1.) (BOMBLIES *et al.* 2009). De plus, les populations échantillonnées sont proches de la limite nord de l'aire de répartition des deux espèces (COETZEE *et al.* 2000) et pourraient être considérées comme des populations marginales, par opposition aux populations vivant au coeur de la zone de présence, dans des conditions optimales. La structure démographique et génétique de telles populations d'*An. gambiae* s.l. mériterait d'être étudiée, notamment car c'est dans la périphérie de la zone de transmission de *P. falciparum* que des programmes d'élimination du paludisme pourraient être expérimentés dans le futur. Une revue récente (KAWECKI 2008) souligne les principales caractéristiques démographiques tendant à différer entre populations marginales et centrales. Ainsi, en habitat limite, la densité de population et le succès reproducteur sont généralement inférieurs, et de légères variations des conditions environnementales peuvent avoir un impact important sur la persistence des populations, les rendant par conséquent bien plus exposées au risque d'extinction locale. Ces caractéristiques impliquent notamment que les populations centrales ont une influence

importante sur la composition génétique des populations marginales, du fait d'un phénomène de migration asymétrique du centre de l'aire de répartition de l'espèce vers l'éxtérieur. De telles interactions pourraient jouer un rôle dans le modelage de la structure génétique des populations anophéliennes au Sahel. La stabilité des fréquences alléliques observée entre les saisons des pluies 2005 et 2006 nous a conduit à supposer un maintien des populations localement malgré les conditions défavorables de la longue saison sèche. Des résultats similaires ont été observés sur plusieurs années pour *An. gambiae* (LEHMANN *et al.* 1998) et *An. arabiensis* (SIMARD *et al.* 2000). On ne peut toutefois pas exclure formellement la survenue occcasionnelle de goulot d'étranglement génétique ou d'extinction locale, dont la mise en évidence nécessiterait un suivi à plus long terme des populations. Cependant, dans le cas où ce type d'évènement démographique serait suffisament fréquent dans le temps et l'espace, il est probable qu'une structuration génétique soit observée entre sites distants du fait des effets fondateurs engendrés localement, faisant varier les fréquences alléliques de manière aléatoire. Cette hypothèse dépend bien sûr de l'ampleur des réductions populationnelles, du temps nécessaire à l'homogénéisation des fréquences allèliques en fonction de l'importance des flux géniques, ainsi que de la composition génétique des populations sources à partir desquelles les zones d'extinction sont progressivement recolonisées.

En lien avec cette problématique, l'influence potentielle de l'histoire démographique des populations sur les estimations de différenciation génétique a également été mentionnée en discussion. En effet, dans le cas d'une population ayant connu une expansion spatiale passée, les estimations indirectes de mouvements d'individus et de flux géniques faites à partir des valeurs de F_{ST} pourraient être surestimées du fait que l'équilibre mutation-dérive ne soit pas vérifié. L'hypothèse d'une expansion ou d'une réduction populationnelle récente peut être évaluée à l'aide d'un test statistique comparant l'hétérozygotie attendue calculée à partir des fréquences alléliques observées (H_E), avec l'hétérozygotie attendue à l'équilibre mutation-dérive (H_{EQ}) basée sur le nombre d'allèles et la taille des échantillons. Ce test est mis en œuvre dans le logiciel BOTTLENECK (CORNUET and LUIKART 1996) sous différents

modèles mutationnels. Dans le cas d'un bottleneck récent et de loci neutres, la perte d'allèles par dérive génétique est plus rapide que la chute d'hétérozygotie, donc H_E sera transitoirement supérieur à H_{EQ} (NEI *et al.* 1975), avant le retour à un état d'équilibre entre mutation et dérive. A l'inverse, l'expansion récente d'une population peut entrainer un H_E inférieur à H_{EQ} du fait d'une augmentation du nombre d'allèles plus rapide que l'hétérozygotie, avec l'apparition de nouveaux allèles rares. L'hétérozygotie des échantillons d'*An. arabiensis* et *An. gambiae* calculée à partir du nombre d'allèles a été significativement supérieure à H_E au niveau d'une majorité de loci et de sites (Tableau 14), supportant l'hypothèse d'une expansion récente de ces populations. Le signal d'écart à l'équilibre mutation-dérive a été plus fort dans les échantillons d'*An. arabiensis*.

		IAM		TPM 70%		TPM 90%		SMM	
espèce	échantillon	DH	p	DH	p	DH	p	DH	p
An. arabiensis	Bani 2005	-0,854	**	-2,133	***	-2,855	***	-4,216	***
	Bani 2006	-0,787	*	-2,427	***	-3,575	***	-5,026	***
	Zind 2005	-0,859	*	-2,356	***	-3,739	***	-4,679	***
	Zind 2006	-0,568	NS	-1,971	**	-3,018	**	-4,596	***
	Maichi 2005	-0,682	NS	-2,014	**	-2,961	**	-4,415	***
	Maiko 2005	-0,520	*	-1,575	**	-2,214	**	-3,289	***
	Fara 2005	-0,134	NS	-1,129	*	-1,990	*	-2,767	**
	Fara 2006	-0,631	NS	-2,212	**	-3,336	***	-5,201	***
	Damag 2005	-0,218	NS	-1,062	*	-2,055	**	-2,518	***
	Damag 2006	-0,529	*	-1,737	**	-2,806	***	-4,034	***
	all	-0,872	NS	-4,449	***	-6,607	***	-11,138	***
An. gambiae	Garey 2005	-0,331	NS	-1,857	NS	-2,845	NS	-2,523	***
	Garey 2006	-0,061	NS	-1,036	NS	-1,674	NS	-2,925	NS
	Bani 2005	-0,023	NS	-1,224	*	-2,037	**	-3,339	**
	Bani 2006	-0,197	NS	-1,542	NS	-2,327	**	-3,554	***
	Zind 2005	-0,299	NS	-1,616	NS	-2,448	*	-4,095	**
	Zind 2006	-0,523	NS	-2,061	NS	-2,918	*	-3,234	**
	Maichi 2005	-0,350	NS	-1,940	NS	-2,872	*	-2,625	**
	Maiko 2005	-0,498	NS	-2,320	NS	-3,147	**	-4,093	**
	Fara 2005	-0,508	NS	-2,101	*	-3,083	***	-4,830	***
	Fara 2006	-0,522	NS	-2,213	*	-3,151	**	-4,933	***
	all	-0,144	NS	-3,008	*	-4,702	***	-5,042	***

Tableau 14. Résultats du test de détection d'expansion ou de réduction populationnelle (CORNUET and LUIKART 1996), sous les différents modèles mutationnels. Sont présentés la différence standardisée de H_E par rapport à H_{EQ} (DH), et le niveau de significativité statistique du test de Wilcoxon (p), avec * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. IAM, Infinite Allele Model. TPM, Two Phase Model. SMM, Stepwise Mutation Model. Bani, Banizoumbou. Zind, Zindarou. Maichi, Maichilmi. Maiko, Maikogo. Fara, Fararatt. Damag, Damagaram Takaya.

Enfin, la détermination des fréquences alléliques des marqueurs microsatellites au cours des saisons des pluies 2005 et 2006 a permis d'estimer l'effectif efficace des populations échantillonnées (Tableau 15) (WAPLES 1989). Chaque valeur de N_e est calculée à partir des fluctuations alléliques temporelles entre deux évènements de capture. La période d'un an étudiée ici a englobé la mise en place des moustiquaires imprégnées en décembre 2005.

	An. gambiae M		*An. arabiensis*	
Site	Ne	IC 95%	Ne	IC 95%
Garey	706	[289 - 13267]	-	
Banizoumbou	8780	[706 - ∞]	767	[276 - ∞]
Zindarou	3442	[627 - ∞]	1344	[417 - ∞]
Maichilmi	227	[98 - 1503]	239	[91 - ∞]
Maikogo	587	[227 - ∞]	∞	[591 - ∞]
Farrarat	1428	[489 - ∞]	406	[201 - 1187]
Damagaram	-		587	[240 - 7063]

Tableau 15. Estimation des effectifs efficaces (N_e) des échantillons d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*, considérant les douze loci étudiés.

En concordance avec la stabilité des indices de diversité génétique et l'homogénéité spatiale des populations, les N_e estimés sont relativement élevés, présentant souvent un intervalle de confiance avec une limite supérieure non bornée. Les valeurs semblent globalement inférieures pour les échantillons d'*An. arabiensis*, de l'ordre de quelques centaines d'individus. Ces valeurs sont très comparables à celles obtenues à Barkedji, village sahélien au nord du Sénégal (SIMARD *et al.* 2000). Pour les deux espèces, le N_e est sensiblement plus élevé à Banizoumbou et Zindarou. Même si l'interprétation des valeurs obtenues au regard de l'effet supposé de réduction du N_e par la couverture nationale en moustiquaires imprégnées est difficile, l'ordre de grandeur des effectifs estimés apporte un élément supplémentaire pour rejeter l'hypothèse d'une réduction drastique suite à leur mise en place.

Discussion générale

Les résultats majeurs concernant le suivi des populations anophéliennes dans le cadre de la distribution nationale de moustiquaires imprégnées au Niger sont rassemblés dans ce mémoire. Les programmes opérationnels de contrôle du paludisme de ce type se multiplient dans les zones d'endémie, sous l'impulsion de l'initiative RBM lancée en 1998 et grâce à l'augmentation des fonds alloués, bénéficiant des dernières avancées en terme de prévention et de traitement des infections à *Plasmodium*. Ces efforts portent leurs fruits, ainsi plusieurs pays africains à fort niveau de transmission ont vu les indicateurs de morbidité et/ou de mortalité palustre chuter significativement suite au déploiement des mesures de lutte préconisées (WHO 2009b). Ces études n'ont généralement pas comporté de volet entomologique, et nos résultats apportent des éléments nouveaux pour la compréhension de la réponse des populations de vecteurs de *P. falciparum* face à la mise à l'échelle de l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides en Afrique sub-Saharienne. Nous avons ainsi publié la première étude décrivant l'expansion de la mutation *kdr* chez *An. gambiae* s.s. vraisemblablement provoquée par un couverture nationale de moustiquaires imprégnées Permanet. Même si le lien de causalité entre l'intervention et la résistance n'a pas été formellement établi, il est fortement suspecté étant donné que les populations de la zone sahélienne du Niger, principalement rurales, n'ont qu'un accès très limité aux insecticides, tant pour la protection personnelle que pour le traitement des cultures. La baisse globale du niveau de transmission par les populations d'*An. gambiae* s.l. mesurée dans les deux premières années de couverture en LLINs est également la première

évidence de l'efficacité d'un programme opérationnel d'une telle ampleur, résultats qui seront rapidement soumis à publication.

La nature et l'échelle spatiale du suivi nous ont conduites à adapter les méthodes d'analyse en conséquence, tout en prenant en compte le contexte de transmission de *Plasmodium*. Les publications antérieures ainsi que des résultats non publiés obtenus au CERMES ont montré l'importante hétérogénéité des profils de transmission à l'intérieur du Niger, à l'échelle des zones éco-climatiques depuis des zones de transmission forte au sud jusqu'à une absence complète dans la zone désertique, ainsi qu'à échelle plus fine, parfois entre villages proches. Cette variabilité de l'intensité de transmission résulte de la variabilité environnementale, qui a été étudiée en parallèle par l'unité Santé-Environnement-Climat du CERMES. Avec également un suivi des populations parasitaires, étudiées par le biais des infestations asymptomatiques mais aussi par celui des infections cliniques, les résultats du suivi entomologique s'inscrivent dans un cadre multidisciplinaire plus large. Pour les besoins du suivi transversal mené sur toute la gamme de longitudes au niveau de la bande sahélienne, l'effort d'échantillonnage a été important. Même si la plupart des résultats présentés concernent les échantillons collectés durant les saisons des pluies, l'ensemble des sept passages dans les villages ont représenté 144 nuits de captures pour l'équipe de terrain, ayant permis la collecte et l'identification de plus de 38000 anophèles femelles. Les analyses moléculaires mises en œuvre au laboratoire durant ces trois années ont impliqué l'extraction de l'ADN de 2294 *An. gambiae* femelles, l'amplification par PCR de 18929 réactions, dont 7361 ont été déposées sur gel d'agarose pour migration électrophorétique tandis que 11568 ont été par la suite analysées sur séquenceur capillaire, ainsi que la recherche d'antigène CSP par ELISA sur 9978 femelles. D'une manière générale, les résultats obtenus sont cohérents avec la littérature récente, concernant la répartition des espèces du complexe *An. gambiae*, l'occurrence de la mutation *kdr* et la structure génétique des populations. Le fait que les mêmes spécimens collectés dans les sites sentinelles aient été utilisés pour l'étude des différents paramètres est un atout certain, permettant

d'appréhender globalement l'hétérogénéité de ces populations et de pouvoir confronter les variations spatiales ou temporelles de plusieurs indicateurs.

Ces résultats sont importants à plusieurs titres. D'abord, dans une optique de santé publique, car trop peu de données entomologiques sont à ce jour disponibles sur les effets de programmes opérationnels de lutte contre le paludisme d'envergure nationale. Nous montrons ainsi que ce type de suivi à grande échelle est faisable, et fournissons des résultats intéressants, replacés dans le contexte de la distribution nationale de moustiquaires imprégnées menée au Niger en 2005. L'efficacité des LLINs en tant qu'outil est démontrée, mais la viabilité d'une généralisation de fortes couvertures en Afrique sub-Saharienne doit être étudiée dans la durée. Le suivi présenté ici représente l'étape la plus en aval du processus de recherche et d'évaluation de nouveaux moyens de lutte antivectorielle, après la mise au point des stratégies de lutte à partir des connaissances fondamentales sur les espèces visées, leur évaluation au laboratoire, puis sur le terrain dans des études pilotes bien contrôlées. Ainsi les résultats publiés pourront être pris en compte lors de la définition de la mise en œuvre de nouvelles interventions par les bailleurs de fonds et programmes de lutte, et encourager l'inclusion de volets de suivi des populations de vecteurs, a minima concernant la surveillance du développement de mécanismes de résistance aux insecticides dans les populations ciblées. Les résultats de distribution des espèces du complexe *An. gambiae* ont permis de préciser l'hétérogénéité du système de transmission de *P. falciparum* au sein de la zone sahélienne du Niger, et pourraient permettre d'orienter de futures actions de lutte ciblées et/ou de prospections entomologiques. Résultat majeur de ce travail, la hausse de la fréquence de la mutation *kdr* est très fortement suspectée d'avoir été provoquée par la pression de sélection exercée à grande échelle par les LLINs. Les faibles fréquences de la mutation observées ainsi que sa présence quasiment exclusivement dans des individus hétérozygotes n'ont probablement aucun effet sur l'efficacité de protection des moustiquaires. Néanmoins, les hausses successives observées huit puis vingt mois après la

mise en place des moustiquaires constituent une sérieuse mise en garde pour les responsables de l'implémentation et du suivi des programmes de contrôle menés au Niger.

Ensuite, d'un point de vue scientifique, nos résultats contribuent à la description des populations anophéliennes de la zone sahélienne du Niger, venant compléter les connaissances de la répartition d'*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* en Afrique de l'Ouest. La zone étudiée est d'autant plus intéressante qu'elle a semblé coïncider avec la limite nord-orientale de la forme M d'*An. gambiae* s.s., limite dont la localisation précise et la stabilité temporelle ne sont actuellement pas connues. D'autre part, malgré la localisation relativement marginale des sites d'étude par rapport à la zone de présence d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis*, l'étude de génétique des populations a indiqué une homogénéïté génétique intraspécifique, tant dans l'espace entre villages, que dans le temps entre années. De tels résultats n'étaient pas attendus au vu de l'importante variabilité saisonnière de ces populations, les rendant quasiment impossibles à échantillonner durant plusieurs mois de saisons sèche dans une majorité de sites. Ces résultats sont très intéressants car ils démontrent l'adaptation d'*An. gambiae* M et d'*An. arabiensis* aux conditions éco-climatiques du Sahel, et soutiennent l'hypothèse du dème diffus, impliquant le maintien des populations localement entre deux saisons favorables. Les méthodes mises en œuvre pour l'analyse des marqueurs microsatellites ne permettent pas d'exclure l'influence de certains paramètres, notamment démographiques, sur les résultats de faible structuration des populations et l'hypothèse de flux géniques importants. Dans ce contexte, la hausse temporelle rapide et générale de la mutation *kdr* dans tous les échantillons d'*An. gambiae* M fournit un argument renforçant l'hypothèse de mouvements importants d'individus, ayant entrainé la propagation rapide de la mutation au sein de la zone sahélienne. Enfin, malgré la sélection exercée au locus *kdr*, aucun effet n'a été observé sur l'ensemble du génome, et les marqueurs microsatellites les plus proches génotypés sur l'hémi-chromosome 2L (Ag2H523 et Ag2H117) sont relativement éloignés, excluant la possibilité d'une liaison génétique physique avec le locus *kdr*.

Conclusion, perspectives

I. Conclusion

Les résultats obtenus ont permis de préciser la distribution et les caractéristiques des populations de vecteurs de *Plasmodium* dans la zone sahélienne du Niger, et de suivre leur évolution suite à la mise en place de moustiquaires imprégnées d'insecticides pyréthrinoïdes à longue rémanence dans l'ensemble du pays, premier programme d'une telle ampleur jamais implémenté. Le long du transect sahélien ouest-est étudié, compris entre 13 et 15° de lattitude Nord, d'importantes variations de la composition des populations ont été observées, avec notamment un gradient longitudinal d'abondance d'*An. gambiae* s.l. et de proportion relative d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*.

Le suivi temporel mené sur trois ans a permis de mettre en évidence une baisse globale du niveau de transmission de *P. falciparum* probablement entraînée par la forte hausse d'utilisation de moustiquaires imprégnées. Cependant la hausse de la résistance des populations aux pyréthrinoïdes semble avoir été rapidement amorcée, faisant craindre à moyen terme une perte d'efficacité de cet outil central des stratégies de lutte contre le paludisme. Le potentiel de propagation d'un gène sélectionné apparaît en effet important, compte tenu des flux géniques importants mis en évidence à l'intérieur de la zone d'étude.

Ce travail souligne l'importance de documenter les effets de telles interventions de contrôle du paludisme par le biais d'études de terrain, dont les conclusions permettront d'adapter la définition et la mise en place des stratégies de lutte afin d'en améliorer l'efficacité. Tout comme pour l'intervention suivie au cours de ce travail, il est de la responsabilité des bailleurs de fonds d'exiger une évaluation scientifique des programmes de lutte, et de celle des équipes d'évaluation de convaincre les bailleurs fonds de l'utilité d'une telle démarche.

II. Perspectives

Après la réussite de la campagne de masse de 2005, les ressources mobilisées par le fond mondial et d'autres bailleurs ont permis de maintenir et d'étendre la couverture en LLINs au Niger, une nouvelle distribution de masse ayant été effectuée en 2009 afin de remplacer les moustiquaires arrivées en fin de vie et d'atteindre l'ensemble de la population. Des efforts sont également faits pour maintenir le taux de couverture dans la durée par le biais des formations sanitaires, notamment pour assurer la protection des enfants nés après les campagnes de distribution de masse. Dans ce contexte d'intensification de l'usage des LLINs au Niger, il serait très souhaitable que le niveau de résistance des populations d'*An. gambiae* et *An. funestus* soit régulièrement évalué. La priorité a ici été donnée à la recherche de la mutation *kdr*, considérée comme principal mécanisme de résistance, mais il serait intéressant d'investiguer la présence de mécanismes métaboliques ainsi que les niveaux de résistance phénotypiques des populations. Dans ce but, le CERMES gagnerait à intégrer le réseau africain de surveillance de la résistance des vecteurs aux insecticides, financé par le programme TDR de l'OMS depuis 2008 et incluant le Burkina Faso, le Bénin, le Tchad, le

Soudan et l'Angola. Concernant l'étude de la structure génétique des populations d'*An. gambiae*, les efforts de plusieurs pays proches pourraient également être mis en commun au sein d'une initiative régionale, afin d'en obtenir une vision plus complète à l'intérieur de l'Afrique de l'Ouest et Centrale, et d'appréhender l'influence du gradient éco-climatique sur cette structure. Outre les publications présentant nos résultats, un retour d'information sur l'ensemble de ce travail a été effectué à destination des instances concernées, dont le programme national de lutte contre le paludisme du Niger, le CERMES, le FMSTP et la Fédération Internationale de la Croix-Rouge et du Croissant Rouge.

La couverture des populations d'Afrique sub-Saharienne en moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes a significativement augmenté au cours de la décennie 2000-2010, cependant de larges zones fortement peuplées telles que la République Démocratique du Congo et le Nigeria sont en retard, là où surviennent une grande part des accès palustres (WHO 2009b). Quelle que soit l'ampleur des programmes de contrôle planifiés puis implémentés, une analyse scientifique rigoureuse et objective des organismes et paramètres d'intérêt devrait être menée, seul moyen de rendre compte des implications réelles des interventions sur le terrain. Ce type d'étude représente un défi pour les équipes scientifiques, dans la définition et la mise en œuvre des projets de recherche, afin d'identifier les indicateurs et méthodes d'analyses pertinents, et de mener à bien les différents volets de projets multidisciplinaires. De plus, l'adjonction d'un suivi-évaluation à un programme de contrôle a bien entendu un coût, et il est du ressort des chercheurs et spécialistes de convaincre les bailleurs de fonds de leur intérêt, dans le but de capitaliser les efforts déployés en documentant leurs effets. C'est en effet par ce biais qu'un meilleur choix des stratégies de lutte pourra être fait, en fonction des conditions propres aux pays concernés, avec comme objectifs non seulement un gain rapide pour la santé des populations, mais également le maintien durable de l'efficacité des différents outils disponibles.

L'intensification des efforts de contrôle du paludisme dans un certains nombre de pays africains depuis le lancement de l'initiative RBM a permis d'augmenter considérablement les populations protégées et a montré des résultats prometteurs, avec des baisses de morbidité et de mortalité dues au paludisme. Si la possibilité d'élimination du paludisme est évoquée dans certaines zones de transmission modérée, certains soulignent le risque que les outils principaux perdent rapidement leur efficacité, donc l'urgence de développer de nouvelles méthodes de lutte durables. Cette question est particulièrement sensible concernant les LLINs, étant donné que seuls les pyréthrinoïdes sont actuellement utilisés pour leur imprégnation, et que les résultats les plus récents montrent une tendance générale d'augmentation du niveau de résistance des populations de vecteurs à cette classe de molécules insecticides (DABIRE *et al.* 2009; RANSON *et al.* 2009).

La recherche de nouveaux composés est activement menée (HEMINGWAY *et al.* 2006), mais la lutte chimique classique entraîne irrémédiablement l'apparition de phénomènes de résistance. Par conséquent, au delà de la gestion de la résistance ne faisant au mieux que retarder son évolution, principalement par l'emploi de plusieurs composés en combinaison, le concept de méthodes de contrôle "*evolution-proof*" doit être développé (KNOLS *et al.* 2010; READ *et al.* 2009), ainsi que les méthodes alternatives génétiques et biologiques. Cependant le processus de recherche de ces nouveaux outils nécessitera du temps, depuis leur définition jusqu'aux études d'efficacité en conditions contrôlées puis opérationnelles, et il est primordial que la durée de vie des outils actuels soit optimisée.

Références bibliographiques

ABDALLA, H., T. S. MATAMBO, L. L. KOEKEMOER, A. P. MNZAVA, R. H. HUNT *et al.*, 2008 Insecticide susceptibility and vector status of natural populations of Anopheles arabiensis from Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg **102:** 263-271.

AGEEP, T. B., J. COX, M. M. HASSAN, B. G. KNOLS, M. Q. BENEDICT *et al.*, 2009 Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito Anopheles arabiensis in northern Sudan: influence of environmental factors and implications for vector control. Malar J **8:** 123.

AKOGBETO, M. C., R. F. DJOUAKA and D. A. KINDE-GAZARD, 2006 Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. Malar J **5:** 22.

ALONSO, P. L., S. W. LINDSAY, J. R. ARMSTRONG, M. CONTEH, A. G. HILL *et al.*, 1991 The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. Lancet **337:** 1499-1502.

AMIN, A. M., and J. HEMINGWAY, 1989 Preliminary investigation of the mechanisms of DDT and pyrethroid resistance in Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) from Saudi Arabia. Bull Entomol Res **79:** 361-366.

ASIDI, A. N., R. N'GUESSAN, R. A. HUTCHINSON, M. TRAORE-LAMIZANA, P. CARNEVALE *et al.*, 2004 Experimental hut comparisons of nets treated with carbamate or pyrethroid insecticides, washed or unwashed, against pyrethroid-resistant mosquitoes. Med Vet Entomol **18:** 134-140.

ASIDI, A. N., R. N'GUESSAN, A. A. KOFFI, C. F. CURTIS, J. M. HOUGARD *et al.*, 2005 Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambdacyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus mosquitoes. Malar J **4:** 25.

ATIELI, H. E., D. MENYA, A. GITHEKO and T. SCOTT, 2009 House design modifications reduce indoor resting malaria vector densities in rice irrigation scheme area in western Kenya. Malar J **8:** 108.

AWOLOLA, T. S., A. O. ODUOLA, J. B. OBANSA, N. J. CHUKWURAR and J. P. UNYIMADU, 2007a Anopheles gambiae s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. J Vector Borne Dis **44:** 241-244.

AWOLOLA, T. S., A. O. ODUOLA, I. O. OYEWOLE, J. B. OBANSA, C. N. AMAJOH *et al.*, 2007b Dynamics of knockdown pyrethroid insecticide resistance alleles in a field population of Anopheles gambiae s.s. in southwestern Nigeria. J Vector Borne Dis **44:** 181-188.

AWOLOLA, T. S., I. O. OYEWOLE, C. N. AMAJOH, E. T. IDOWU, M. B. AJAYI *et al.*, 2005 Distribution of the molecular forms of Anopheles gambiae and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. Acta Trop **95:** 204-209.

AYALA, F. J., and M. COLUZZI, 2005 Chromosome speciation: humans, Drosophila, and mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A **102 Suppl 1:** 6535-6542.

BARKER, G. C., 2002 Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg **96:** S1/21-S21/24.
BAUDON, D., P. CARNEVALE, V. ROBERT, F. PEYRON, L. SIBI SONA *et al.*, 1986 Etude épidémiologique du paludisme dans la région de Tillabéri (nord-ouest du Niger). Med Afr Noire **33:** 281-290.
BAYOH, M. N., D. K. MATHIAS, M. R. ODIERE, F. M. MUTUKU, L. KAMAU *et al.*, 2010 Anopheles gambiae: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. Malar J **9:** 62.
BECKER, N., 1998 The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. Israel J Entomol **32:** 63-69.
BEIER, J. C., C. M. ASIAGO, F. K. ONYANGO and J. K. KOROS, 1988 absorbance cut-off method affects malaria sporozoite determination in wild Afrotropical Anopheles. Med Vet Entomol **2:** 259-264.
BEIER, J. C., P. V. PERKINS, J. K. KOROS, F. K. ONYANGO, T. P. GARGAN *et al.*, 1990 Malaria sporozoite detection by dissection and ELISA to assess infectivity of Afrotropical Anopheles (Diptera: Culicidae). J Med Entomol **27:** 377-384.
BELKHIR, K., P. BORSA, L. CHIKHI, N. RAUFASTE and F. BONHOMME, 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
BERZOSA, P. J., J. CANO, J. ROCHE, J. M. RUBIO, L. GARCIA *et al.*, 2002 Malaria vectors in Bioko Island (Equatorial Guinea): PCR determination of the members of Anopheles gambiae Giles complex (Diptera: Culicidae) and pyrethroid knockdown resistance (kdr) in An. gambiae sensu stricto. J Vector Ecol **27:** 102-106.
BESANSKY, N. J., T. LEHMANN, G. T. FAHEY, D. FONTENILLE, L. E. BRAACK *et al.*, 1997 Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, Anopheles gambiae and An. arabiensis, suggest extensive gene flow. Genetics **147:** 1817-1828.
BHATTARAI, A., A. S. ALI, S. P. KACHUR, A. MARTENSSON, A. K. ABBAS *et al.*, 2007 Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. PLoS Med **4:** e309.
BINKA, F. N., F. INDOME and T. SMITH, 1998 Impact of spatial distribution of permethrin-impregnated bed nets on child mortality in rural northern Ghana. Am J Trop Med Hyg **59:** 80-85.
BLACKLOCK, D. B., and C. WILSON, 1941 Notes on Anopheles gambiae and A. gambiae var. Melas in Freetown and its vicinity. N. C. **N.C.:** 37-42.
BLANFORD, S., B. H. K. CHAN, N. JENKINS, D. SIM, R. J. TURNER *et al.*, 2005 Fungal pathogens reduces potential for malaria transmission. Science **308:** 1638-1641.
BOËTE, C., and J. C. KOELLA, 2003 Evolutionary ideas about genetically manipulated mosquitoes and malaria control. Trends Parasitol **19:** 32-38.
BOMBLIES, A., J. B. DUCHEMIN and E. A. ELTAHIR, 2008 Hydrology of malaria: Model development and application to a Sahelian village. Water Resour Res **44:** W12445.
BOMBLIES, A., J. B. DUCHEMIN and E. A. ELTAHIR, 2009 A mechanistic approach for accurate simulation of village scale malaria transmission. Malar J **8:** 223.
BOSSART, J. L., and D. PASHLEY PROWELL, 1998 Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. TREE? **13:** 202-206.
BOUDIN, C., V. ROBERT, P. CARNEVALE, J. P. VERHAVE and J. H. MEUWISSEN, 1988 Utilisation de la technique ELISA dans le dépistage des moustiques infectés par Plasmodium falciparum. Bull World Health Organ **66:** 87-97.
BOULESTEIX, M., F. SIMARD, C. ANTONIO-NKONDJIO, H. P. AWONO-AMBENE, D. FONTENILLE *et al.*, 2007 Insertion polymorphism of transposable elements and population structure of Anopheles gambiae M and S molecular forms in Cameroon. Mol Ecol **16:** 441-452.
BRADLEY, A. K., B. M. GREENWOOD, A. M. GREENWOOD, K. MARSH, P. BYASS *et al.*, 1986 Bed-nets (mosquito-nets) and morbidity from malaria. Lancet **2:** 204-207.

BROWN, A. W. A., 1986 Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. J Am Mosq Control Assoc **2:** 123-140.
BROWN, A. W. A., and R. PAL, 1973 Insecticide resistance in arthropods. Monograph Series, No. 38, World Health Organization, Geneva.
BRUCE-CHWATT, L. J., and H. M. ARCHIBALD, 1959 Malaria control pilot project in western Sokoto, northern Nigeria. A report of four years' results. Proceedings of the sixth international congress of tropical medicine and malaria, Lisbonne, 1958 **7:** 347-361.
BRUNHES, J., G. LE GOFF and B. GEOFFROY, 1999 Afro-tropical anopheline mosquitoes. III. Description of three new species: Anopheles carnevalei sp. nov., An. hervyi sp. nov., and An. dualaensis sp. nov., and resurrection of An. rageaui Mattingly and Adam. J Am Mosq Control Assoc **15:** 552-558.
BRUNHES, J., P. VENARD, B. DIALLO and A. DYEMKOUMA, 1966 Compte-rendu de la prospection entomologique faite dans l'est de la République du Niger. 14/DOC/65, OCCGE - Centre Muraz, Bobo Dioulasso.
BRYAN, J. H., M. A. DI DECO, V. PETRARCA and M. COLUZZI, 1982 Inversion polymorphism and incipient speciation in Anopheles gambiae s. str. in The Gambia, West Africa. Genetica **59:** 167-176.
BURKOT, T. R., P. GARNER, R. PARU, H. DAGORO, A. BARNES *et al.*, 1990 Effects of untreated bed nets on the transmission of Plasmodium falciparum, P. vivax and Wuchereria bancrofti in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg **84:** 773-779.
BURKOT, T. R., J. L. WILLIAMS and I. SCHNEIDER, 1984 Identification of Plasmodium falciparum-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg **33:** 783-788.
CACCONE, A., G. MIN and J. R. POWELL, 1998 Multiple Origins of Cytologically Identical Chromosome Inversions in the Anopheles gambiae Complex. Genetics **150:** 807-814.
CAMPBELL, H., P. BYASS and B. M. GREENWOOD, 1987 Bed-nets and malaria suppression. Lancet **1:** 859-860.
CARLSON, D. A., and M. W. SERVICE, 1979 Differentiation between species of the Anopheles gambiae Giles complex (Diptera: Culicidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. Ann Trop Med Parasitol **73:** 589-592.
CARNEVALE, P., V. ROBERT, C. BOUDIN, J. M. HALNA, L. PAZART *et al.*, 1988 [Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso]. Bull Soc Pathol Exot Filiales **81:** 832-846.
CARNEVALE, P., V. ROBERT, S. MANGUIN, V. CORBEL, D. FONTENILLE *et al.*, 2009 *Les anophèles. Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Editions, Marseille, 389 pp.
CARNEVALE, P., V. ROBERT, J. F. MOLEZ and D. BAUDON, 1984 Epidémiologie générale: faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique Subsaharienne. Etudes Med **3:** 123-133.
CHANDRE, F., F. DARRIET, S. DUCHON, L. FINOT, S. MANGUIN *et al.*, 2000 Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in Anopheles gambiae. Med Vet Entomol **14:** 81-88.
CHANDRE, F., F. DARRIET, L. MANGA, M. AKOGBETO, O. FAYE *et al.*, 1999a Status of pyrethroid resistance in Anopheles gambiae sensu lato. Bull World Health Organ **77:** 230-234.
CHANDRE, F., F. DARRIET, S. MANGUIN, C. BRENGUES, P. CARNEVALE *et al.*, 1999b Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of Anopheles gambiae s.s. from Cote d'Ivoire. J Am Mosq Control Assoc **15:** 53-59.
CHANDRE, F., S. MANGUIN, C. BRENGUES, J. DOSSOU YOVO, F. DARRIET *et al.*, 1999c Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in Anopheles gambiae complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. Parassitologia **41:** 319-322.
CHARLWOOD, J. D., 1986 A differential response to mosquito nets by Anopheles and Culex mosquitoes from Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg **80:** 958-960.

CHEN, H., A. K. GITHEKO, J. I. GITHURE, J. MUTUNGA, G. ZHOU *et al.*, 2008 Monooxygenase levels and knockdown resistance (kdr) allele frequencies in Anopheles gambiae and Anopheles arabiensis in Kenya. J Med Entomol **45:** 242-250.
CHEN, H., N. MINAKAWA, J. BEIER and G. YAN, 2004 Population genetic structure of Anopheles gambiae mosquitoes on Lake Victoria islands, west Kenya. Malar J **3:** 48.
CHOUAIBOU, M., J. ETANG, T. BREVAULT, P. NWANE, C. K. HINZOUMBE *et al.*, 2008 Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. Trop Med Int Health **13:** 476-486.
CHWATT, L. J., 1945 Studies on the melanic variety of Anopheles gambiae in Southern Nigeria. J Trop Med Hyg **48:** 22-30.
CLARKE, S. E., C. BOGH, R. C. BROWN, M. PINDER, G. E. WALRAVEN *et al.*, 2001 Do untreated bednets protect against malaria? Trans R Soc Trop Med Hyg **95:** 457-462.
COETZEE, M., M. CRAIG and D. LE SUEUR, 2000 Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the Anopheles gambiae complex. Parasitol Today **16:** 74-77.
COLLINS, F. H., M. A. MENDEZ, M. O. RASMUSSEN, P. C. MEHAFFEY, N. J. BESANSKY *et al.*, 1987 A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the Anopheles gambiae complex. Am J Trop Med Hyg **37:** 37-41.
COLLINS, F. H., and S. M. PASKEWITZ, 1996 A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. Insect Mol Biol **5:** 1-9.
COLLINS, F. H., S. M. PASKEWITZ and V. FINNERTY, 1989 Ribosomal RNA genes of the Anopheles gambiae species complex. Adv Disease Vector Res **6:** 1-28.
COLLINS, F. H., V. PETRARCA, S. MPOFU, D. BRANDLING-BENNETT, J. B. O. WERE *et al.*, 1988 Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected Anopheles gambiae complex mosquitoes. Am J Trop Med Hyg **39:** 545-550.
COLUZZI, M., 1964 Morphological Divergences In The Anopheles Gambiae Complex. Riv Malariol **43:** 197-232.
COLUZZI, M., 1968 Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche del complesso gambiae del genere Anopheles. Parassitologia **10:** 179-184.
COLUZZI, M., V. PETRARCA and M. A. DI DECO, 1985 Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in Anopheles gambiae. Boll Zool **52:** 45-63.
COLUZZI, M., and A. SABATINI, 1967 Cytogenetic observations on species A and B of the Anopheles gambiae complex. Parassitologia **9:** 73-88.
COLUZZI, M., A. SABATINI, A. DELLA TORRE, M. A. DI DECO and V. PETRARCA, 2002 A polytene chromosome analysis of the Anopheles gambiae species complex. Science **298:** 1415-1418.
COLUZZI, M., A. SABATINI and V. PETRARCA, 1975 Chromosomal investigations on species A and B of the Anopheles gambiae complex in the Garki District (Kano State, Nigeria). Results of species identifications from 1971 to 1974. MPD/TN/75.1 (unpublished document), World Health Organization, Geneva.
COLUZZI, M., A. SABATINI, V. PETRARCA and M. A. DI DECO, 1979 Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. Trans R Soc Trop Med Hyg **73:** 483-497.
COOK, S. M., Z. R. KHAN and J. A. PICKETT, 2007 The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. Annu Rev Entomol **52:** 375-400.
COOSEMANS, M., V. PETRARCA, M. BARUTWANAYO and M. COLUZZI, 1989 Species of the Anopheles gambiae complex and chromosomal polymorphism in a rice-growing area of the Rusizi Valley (Republic of Burundi). Parassitologia **31:** 113-122.
CORBEL, V., F. CHANDRE, C. BRENGUES, M. AKOGBETO, F. LARDEUX *et al.*, 2004 Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of Anopheles gambiae and the selection of pyrethroid resistance. Malar J **3:** 22.
CORBEL, V., J. M. HOUGARD, R. N'GUESSAN and F. CHANDRE, 2003 Evidence for selection of insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase by carbamate-treated nets in Anopheles gambiae s.s. (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire. J Med Entomol **40:** 985-988.

CORBEL, V., R. N'GUESSAN, C. BRENGUES, F. CHANDRE, L. DJOGBENOU *et al.*, 2007 Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus from Benin, West Africa. Acta Trop **101:** 207-216.

CORNUET, J. M., and G. LUIKART, 1996 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics **144:** 2001-2014.

COSTANTINI, C., D. AYALA, W. M. GUELBEOGO, M. POMBI, C. Y. SOME *et al.*, 2009 Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in Anopheles gambiae. BMC Ecol **9:** 16.

COSTANTINI, C., S. G. LI, A. DELLA TORRE, N. SAGNON, M. COLUZZI *et al.*, 1996 Density, survival and dispersal of Anopheles gambiae complex mosquitoes in a west African Sudan savanna village. Med Vet Entomol **10:** 203-219.

COULIBALY, M. B., N. F. LOBO, M. C. FITZPATRICK, M. KERN, O. GRUSHKO *et al.*, 2007a Segmental duplication implicated in the genesis of inversion 2Rj of Anopheles gambiae. PLoS ONE **2:** e849.

COULIBALY, M. B., M. POMBI, B. CAPUTO, D. NWAKANMA, M. JAWARA *et al.*, 2007b PCR-based karyotyping of Anopheles gambiae inversion 2Rj identifies the BAMAKO chromosomal form. Malar J **6:** 133.

COZ, J., 1973 Contribution à l'étude du complexe A. gambiae. Répartition géographique et saisonnière en Afrique de l'Ouest. Cahiers ORSTOM ser Ent. med. et Parasitol. **XI:** 3.

CURTIS, C. F., and J. D. LINES, 1985 Impregnated fabrics against malaria mosquitoes. Parasitol Today **1:** 147.

CUZIN-OUATTARA, N., A. H. A. VAN DEN BROEK, A. HABLUERZEL, A. DIABATE, E. SANOGO-ILBOUDO *et al.*, 1999 Wide-scale installation of insecticide-treated curtains confers high levels of protection against malaria transmission in a hyperendemic area of Burkina Faso. Trans R Soc Trop Med Hyg **93:** 473-479.

CZEHER, C., R. LABBO, I. ARZIKA and J. B. DUCHEMIN, 2008 Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in Anopheles gambiae from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. Malar J **7:** 189.

CZEHER, C., R. LABBO, A. DJIBRILLA, L. HERE, I. ARZIKA *et al.*, 2006 ELISA study of oocyst-sporozoite transition in malaria vectors. Parasite **13:** 257-261.

D'ALESSANDRO, U., B. O. OLALEYE, W. MCGUIRE, P. LANGEROCK, S. BENETT *et al.*, 1995 Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. Lancet **345:** 479-483.

DABIRE, K. R., A. DIABATE, M. NAMOUNTOUGOU, K. H. TOE, A. OUARI *et al.*, 2009 Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in Anopheles gambiae s.l. from Burkina Faso (West Africa). Trans R Soc Trop Med Hyg **103:** 1113-1120.

DABIRE, R. K., A. DIABATE, T. BALDET, L. PARE-TOE, R. T. GUIGUEMDE *et al.*, 2006 Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of Anopheles gambiae s.s. resistance to pyrethroids. Malar J **5:** 12.

DALLAS, J. F., 1992 Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. Mamm Genome **3:** 452-456.

DAME, D. A., C. F. CURTIS, M. Q. BENEDICT, A. S. ROBINSON and B. G. J. KNOLS, 2009 Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. Malar J **8(suppl 2):** S2.

DARRIET, F., 1987 Evaluation sur le terrain de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoïdes et un juvenoïde, dans la lutte contre Anopheles gambiae. Cahiers ORSTOM ser Ent. med. et Parasitol. **numéro spécial:** 113-119.

DARRIET, F., 1991 Field trial of the efficacy of three pyrethroids in the control of malaria vectors. Parassitologia **33:** 111-119.

DARRIET, F., R. N'GUESSAN, A. A. KOFFI, L. KONAN, J. M. DOANNIO *et al.*, 2000 [Impact of pyrethrin resistance on the efficacity of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC]. Bull Soc Pathol Exot **93:** 131-134.

DARRIET, F., V. ROBERT, N. THO VIEN and P. CARNEVALE, 1984 Evaluation of the Efficacy of Permethrin-Impregnated Intact and Perforated Mosquito Nets Against Vectors of Malaria. WHO/VBC/84.899, World Health Organization, Geneva.
DAVIDSON, G., 1964a Anopheles Gambiae, A Complex Of Species. Bull World Health Organ **31:** 625-634.
DAVIDSON, G., 1964b The Five Mating-Types In The Anopheles Gambiae Complex. Riv Malariol **43:** 167-183.
DAVIDSON, G., and R. H. HUNT, 1973 The crossing and chromosome characteristics of a new, sixth species in the Anopheles gambiae complex. Parassitologia **15:** 121-128.
DEAN, A. G., K. M. SULLIVAN and M. M. SOE, OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. [http://www.openepi.com] via the Internet, accessed 2008/04/29.
DELLA TORRE, A., C. FANELLO, M. AKOGBETO, J. DOSSOU-YOVO, G. FAVIA *et al.*, 2001 Molecular evidence of incipient speciation within Anopheles gambiae s.s. in West Africa. Insect Mol Biol **10:** 9-18.
DELLA TORRE, A., L. MERZAGORA, J. R. POWELL and M. COLUZZI, 1997 Selective introgression of paracentric inversions between two sibling species of the Anopheles gambiae complex. Genetics **146:** 239-244.
DELLA TORRE, A., Z. TU and V. PETRARCA, 2005 On the distribution and genetic differentiation of Anopheles gambiae s.s. molecular forms. Insect Biochem Mol Biol **35:** 755-769.
DETINOVA, T. S., 1963 Age-grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria. Série de monographies, N°47, World Health Organization, Geneva.
DEVELOUX, M., A. CHEGOU, A. PRUAL and M. OLIVAR, 1994 Malaria in the oasis of Bilma, Republic of Niger. Trans R Soc Trop Med Hyg **88:** 644.
DIABATE, A., T. BALDET, C. CHANDRE, K. R. DABIRE, P. KENGNE *et al.*, 2003 KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. J Med Entomol **40:** 195-198.
DIABATE, A., T. BALDET, F. CHANDRE, M. AKOOBETO, T. R. GUIGUEMDE *et al.*, 2002a The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in Anopheles gambiae s.l. in Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg **67:** 617-622.
DIABATE, A., T. BALDET, F. CHANDRE, R. T. GUIGUEMDE, C. BRENGUES *et al.*, 2002b First report of the kdr mutation in Anopheles gambiae M form from Burkina Faso, west Africa. Parassitologia **44:** 157-158.
DIABATE, A., C. BRENGUES, T. BALDET, K. R. DABIRE, J. M. HOUGARD *et al.*, 2004 The spread of the Leu-Phe kdr mutation through Anopheles gambiae complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. Trop Med Int Health **9:** 1267-1273.
DIABATE, A., F. CHANDRE, M. ROWLAND, R. N'GUESSAN, S. DUCHON *et al.*, 2006 The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors. Trop Med Int Health **11:** 597-603.
DIABATE, A., R. K. DABIRE, K. HEIDENBERGER, J. CRAWFORD, W. O. LAMP *et al.*, 2008 Evidence for divergent selection between the molecular forms of Anopheles gambiae: role of predation. BMC Evol Biol **8:** 5.
DIABATE, A., R. K. DABIRE, E. H. KIM, R. DALTON, N. MILLOGO *et al.*, 2005 Larval development of the molecular forms of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. J Med Entomol **42:** 548-553.
DIATTA, M., A. SPIEGEL and L. LOCHOUARN, 1998 Similar feeding preferences of Anopheles gambiae and A. arabiensis in Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg **92:** 270-272.
DJENONTIN, A., J. CHABI, T. BALDET, S. IRISH, C. PENNETIER *et al.*, 2009 Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. Malar J **8:** 233.
DMN, 2007 Rapport technique du groupe de travail pluridisciplinaire campagne agro-pastorale 2007. Ministère des transports et de l'aviation civile, Direction de la météorologie nationale, Niamey.

DONNELLY, M. J., V. CORBEL, D. WEETMAN, C. S. WILDING, M. S. WILLIAMSON *et al.*, 2009 Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? Trends Parasitol **25:** 213-219.

DONNELLY, M. J., M. C. LICHT and T. LEHMANN, 2001 Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors Anopheles arabiensis and Anopheles gambiae. Mol Biol Evol **18:** 1353-1364.

DONNELLY, M. J., F. SIMARD and T. LEHMANN, 2002 Evolutionary studies of malaria vectors. Trends Parasitol **18:** 75-80.

DONNELLY, M. J., and H. TOWNSON, 2000 Evidence for extensive genetic differentiation among populations of the malaria vector Anopheles arabiensis in Eastern Africa. Insect Mol Biol **9:** 357-367.

DUCHEMIN, J. B., J. M. TSY, P. RABARISON, J. ROUX, M. COLUZZI *et al.*, 2001 Zoophily of Anopheles arabiensis and An. gambiae in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. Med Vet Entomol **15:** 50-57.

DYEMKOUMA, A., 1961 Compte-rendu de la mission effectuée dans le centre de la République du Niger. Régions d'Agadez, Tahoua et Zinder, 2 au 29 octobre 1961. n° 066, OCCGE,

DYEMKOUMA, A., 1963 Compte-rendu de la mission effectuée dans le centre de la République du Niger. Régions de Tahoua et Zinder, 15 mai au 3 juin 1963. n° 240, OCCGE,

EISELE, T. P., K. A. LINDBLADE, K. A. WANNEMUEHLER, J. E. GIMNIG, F. ODHIAMBO *et al.*, 2005 Effect of sustained insecticide-treated bed net use on all-cause child mortality in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya. Am J Trop Med Hyg **73:** 149-156.

ELISSA, N., J. MOUCHET, F. RIVIERE, J. Y. MEUNIER and K. YAO, 1993 Resistance of Anopheles gambiae s.s. to pyrethroids in Cote d'Ivoire. Ann Soc Belg Med Trop **73:** 291-294.

ESCUDIE, A., and J. HAMON, 1961 Le paludisme en Afrique Occidentale d'expression française. Med Trop **21:** 661-687.

ESNAULT, C., M. BOULESTEIX, J. B. DUCHEMIN, A. A. KOFFI, F. CHANDRE *et al.*, 2008 High genetic differentiation between the M and S molecular forms of Anopheles gambiae in Africa. PLoS ONE **3:** e1968.

ETANG, J., E. FONDJO, F. CHANDRE, I. MORLAIS, C. BRENGUES *et al.*, 2006 First report of knockdown mutations in the malaria vector Anopheles gambiae from Cameroon. Am J Trop Med Hyg **74:** 795-797.

ETANG, J., L. MANGA, F. CHANDRE, P. GUILLET, E. FONDJO *et al.*, 2003 Insecticide Susceptibility Status of Anopheles gambiae s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. J Med Entomol **40:** 491-497.

EXCOFFIER, L., G. LAVAL and S. SCHNEIDER, 2005 Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online **1:** 47-50.

EXCOFFIER, L., P. SMOUSE and J. QUATRO, 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics **131:** 479-491.

FANELLO, C., V. PETRARCA, A. DELLA TORRE, F. SANTOLAMAZZA, G. DOLO *et al.*, 2003 The pyrethroid knock-down resistance gene in the Anopheles gambiae complex in Mali and further indication of incipient speciation within An. gambiae s.s. Insect Mol Biol **12:** 241-245.

FARENHORST, M., J. C. MOUATCHO, C. K. KIKANKIE, B. D. BROOKE, R. H. HUNT *et al.*, 2009 Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A **106:** 17443-17447.

FAVIA, G., A. DELLA TORRE, M. BAGAYOKO, A. LANFRANCOTTI, N. SAGNON *et al.*, 1997 Molecular identification of sympatric chromosomal forms of Anopheles gambiae and further evidence of their reproductive isolation. Insect Mol Biol **6:** 377-383.

FAVIA, G., A. LANFRANCOTTI, L. SPANOS, I. SIDEN-KIAMOS and C. LOUIS, 2001 Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of Anopheles gambiae s.s. Insect Mol Biol **10:** 19-23.

FEGAN, G. W., A. M. NOOR, W. S. AKHWALE, S. COUSENS and R. W. SNOW, 2007 Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study. Lancet **370:** 1035-1039.

GARRETT-JONES, C., 1962 The possibility of active long-distance migrations by Anopheles pharoensis Theobald. Bull World Health Organ **27:** 299-302.

GARRETT-JONES, C., and G. R. SHIDRAWI, 1969 Malaria vectorial capacity of a population of Anopheles gambiae: an exercise in epidemiological entomology. Bull World Health Organ **40:** 531-545.

GENTILE, G., A. DELLA TORRE, B. T. MAEGA, J. R. POWELL and A. CACCONE, 2002 Genetic Differentiation in the African Malaria Vector, Anopheles gambiae s.s., and the Problem of Taxonomic Status. Genetics **161:** 1561-1578.

GENTILE, G., M. SLOTMAN, V. KETMAIER, J. R. POWELL and A. CACCONE, 2001 Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in Anopheles gambiae s.s. Insect Mol Biol **10:** 25-32.

GEORGHIOU, G. P., V. ARIARATNAM and S. G. BREELAND, 1972 Development of resistance to carbamates and organophosphorus compounds in Anopheles albimanus in nature. Bull World Health Organ **46:** 551-554.

GFATM/IFRC, 2006 Integrated Polio Vaccination / Mosquito Net Distribution 19-24 December 2005 - Annual Report.

GIANOTTI, R. L., A. BOMBLIES, M. DAFALLA, I. ISSA-ARZIKA, J. B. DUCHEMIN *et al.*, 2008 Efficacy of local neem extracts for sustainable malaria vector control in an African village. Malar J **7:** 138.

GILLETT, J. D., 1985 The behaviour of Homo sapiens, the forgotten factor in the transmission of tropical disease. Trans R Soc Trop Med Hyg **79:** 12-20.

GILLIES, M. T., and M. COETZEE, 1987 A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). Publ S Afr Inst Med Res **55:** 1-143.

GIMNIG, J. E., M. S. KOLCZAK, A. W. HIGHTOWER, J. M. VULULE, E. SCHOUTE *et al.*, 2003a Effect of permethrin-treated bed nets on the spatial distribution of malaria vectors in western Kenya. Am J Trop Med Hyg **68:** 115-120.

GIMNIG, J. E., K. A. LINDBLADE, D. L. MOUNT, F. K. ATIELI, S. CRAWFORD *et al.*, 2005 Laboratory wash resistance of long-lasting insecticidal nets. Trop Med Int Health **10:** 1022-1029.

GIMNIG, J. E., J. M. VULULE, T. Q. LO, L. KAMAU, M. S. KOLCZAK *et al.*, 2003b Impact of permethrin-treated bed nets on entomologic indices in an area of intense year-round malaria transmission. Am J Trop Med Hyg **68:** 16-22.

GIROD, R., E. ORLANDI-PRADINES, C. ROGIER and F. PAGES, 2006 Malaria transmission and insecticide resistance of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) in the French military camp of Port-Bouet, Abidjan (Cote d'Ivoire): implications for vector control. J Med Entomol **43:** 1082-1087.

GOUDET, J., 2003 Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html Updated from Goudet [1995].

GOUDET, J., M. RAYMOND, T. DE MEEUS and F. ROUSSET, 1996 Testing differentiation in diploid populations. Genetics **144:** 1933-1940.

GRABOWSKY, M., N. FARRELL, W. HAWLEY, J. CHIMUMBWA, S. HOYER *et al.*, 2005 Integrating insecticide-treated bednets into a measles vaccination campaign achieves high, rapid and equitable coverage with direct and voucher-based methods. Trop Med Int Health **10:** 1151-1160.

GRAHAM, K., M. H. KAYEDI, C. MAXWELL, H. KAUR, H. REHMAN *et al.*, 2005 Multi-country field trials comparing wash-resistance of PermaNet and conventional insecticide-treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. Med Vet Entomol **19:** 72-83.

GRAHAM, K., H. REHMAN, M. AHMAD, M. KAMAL, K. IRFANULLAH *et al.*, 2004 Tents pre-treated with insecticide for malaria control in refugee
camps: an entomological evaluation. Malar J **3:** 25.
GRAVES, P. M., B. J. BRABIN and J. D. CHARLWOOD, 1987 Reduction in incidence and prevalence of *Plasmodium falciparum* in under 5-years-old children by permethrin impregnation of mosquito nets. Bull World Health Organ **65:** 869-877.
GRAVES, P. M., D. E. OSGOOD, M. C. THOMSON, K. SEREKE, A. ARAIA *et al.*, 2008 Effectiveness of malaria control during changing climate conditions in Eritrea, 1998-2003. Trop Med Int Health **13:** 218-228.
GREENWOOD, B., and G. TARGETT, 2009 Do we still need a malaria vaccine? Parasit Immunol **31:** 582-586.
GU, W., and R. J. NOVAK, 2009 Agent-based modelling of mosquito foraging behaviour for malaria control. Trans R Soc Trop Med Hyg **103:** 1105-1112.
GU, W., J. L. REGENS, J. C. BEIER and R. J. NOVAK, 2006 Source reduction of mosquito larval habitats has unexpected consequences on malaria transmission. Proc Natl Acad Sci U S A **103:** 17560-17563.
GUILLET, P., R. N'GUESSAN, F. DARRIET, M. TRAORE-LAMIZANA, F. CHANDRE *et al.*, 2001 Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus. Med Vet Entomol **15:** 105-112.
GUO, S. W., and E. A. THOMPSON, 1992 Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics **48:** 361-372.
GUYATT, H. L., and R. W. SNOW, 2002 The cost of not treating bednets. Trends Parasitol **18:** 12-16.
HADIS, M., M. LULU, Y. MAKONNEN and T. ASFAW, 1997 Host choice by indoor-resting Anopheles arabiensis in Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg **91:** 376-378.
HAMILTON, R. J., and M. W. SERVICE, 1983 Value of cuticular and internal hydrocarbons for the identification of larvae of Anopheles gambiae Giles, Anopheles ambiensis Patton and Anopheles melas Theobald. Ann Trop Med Parasitol **77:** 203-210.
HAMON, J., and C. GARRETT-JONES, 1963 [Resistance to insecticides in the major malaria vectors and its operational importance.]. Bull World Health Organ **28:** 1-24.
HAMON, J., S. SALES and J. COZ, 1966 Contribution à l'étude de la répartition des anophèles en Afrique Occidentale. Cahiers ORSTOM Ent. Med. **IV:** 13.
HANCOCK, P. A., 2009 Combining Fungal Biopesticides and Insecticide-Treated Bednets to Enhance Malaria Control. PLoS Comput Biol **5:** e1000525.
HARPER, P. A., E. T. LISANSKY and B. E. SASSE, 1947 Malaria and other insect-borne diseases in the South Pacific campaign, 1942-1945. I. General aspects and control measures. Am J Trop Med Hyg **Suppl. 27:** 1-68.
HARTL, D. L., 1994 *Génétique des populations*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 305 pp.
HASKEW, J., 2006 Final report: National education campaign of mothers in the utilisation of mosquito nets or ''Hang-Up''. International Federation of the Red Cross, Geneva.
HAWLEY, W. A., P. A. PHILLIPS-HOWARD, F. O. TER KUILE, D. J. TERLOUW, J. M. VULULE *et al.*, 2003 Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. Am J Trop Med Hyg **68:** 121-127.
HEMINGWAY, J., B. J. BEATY, M. ROWLAND, T. W. SCOTT and B. L. SHARP, 2006 The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. Trends Parasitol **22:** 308-312.
HEMINGWAY, J., N. J. HAWKES, L. MCCARROLL and H. RANSON, 2004 The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol **34:** 653-665.
HENRY, M. C., S. B. ASSI, C. ROGIER, J. DOSSOU-YOVO, F. CHANDRE *et al.*, 2005 Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in Anopheles gambiae pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire. Am J Trop Med Hyg **73:** 859-864.

HERVY, J. P., G. LE GOFF, B. GEOFFROY, J. P. HERVE, L. MANGA *et al.*, 1998 Les anophèles de la Région Afro-tropicale. Logiciel d'identification et d'enseignement. série Didactiques, ORSTOM éditions, Paris.

HII, J. L., T. SMITH, P. VOUNATSOU, N. ALEXANDER, A. MAI *et al.*, 2001 Area effects of bednet use in a malaria-endemic area in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg **95:** 7-13.

HIMEIDAN, Y. E., H. CHEN, F. CHANDRE, M. J. DONNELLY and G. YAN, 2007 Short report: permethrin and DDT resistance in the malaria vector Anopheles arabiensis from eastern Sudan. Am J Trop Med Hyg **77:** 1066-1068.

HOLM, S., 1979 A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scandinavian Journal of Statistics **6:** 65-70.

HOLT, R. A., G. M. SUBRAMANIAN, A. HALPERN, G. G. SUTTON, R. CHARLAB *et al.*, 2002 The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae. Science **298:** 129-149.

HOSSAIN, M. I., and C. F. CURTIS, 1989 Permethrin-impregnated bednets: behavioural and killing effects on mosquitoes. Med Vet Entomol **3:** 367-376.

HOUGARD, J. M., S. DUCHON, F. DARRIET, M. ZAIM, C. ROGIER *et al.*, 2003 Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. Bull World Health Organ **81:** 324-333.

HOWARD, S. C., J. OMUMBO, C. NEVILL, E. S. SOME, C. A. DONNELLY *et al.*, 2000 Evidence for a mass community effect of insecticide-treated bednets on the incidence of malaria on the Kenyan coast. Trans R Soc Trop Med Hyg **94:** 357-360.

HUNT, R. H., and M. COETZEE, 1986 Chromosomal and electrophoretic identification of a sample of Anopheles gambiae group (Diptera: Culicidae) from the island of Grand Comoros, Indian Ocean. J Med Entomol **23:** 655-660.

HUNT, R. H., M. COETZEE and M. FETTENE, 1998 The Anopheles gambiae complex: a new species from Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg **92:** 231-235.

ICRISAT/FAO, 1996 The World Sorghum and Millet Economies: Facts, Trends and Outlook. [http://www.fao.org/docrep/W1808E/W1808E00.htm] via the Internet, accessed 2008/05/06.

JAENSON, T. G., M. J. GOMES, R. C. BARRETO DOS SANTOS, V. PETRARCA, D. FORTINI *et al.*, 1994 Control of endophagic Anopheles mosquitoes and human malaria in Guinea Bissau, West Africa by permethrin-treated bed nets. Trans R Soc Trop Med Hyg **88:** 620-624.

JANEIRA, F., J. L. VICENTE, Y. KANGANJE, M. MORENO, V. E. DO ROSARIO *et al.*, 2008 A primer-introduced restriction analysis-polymerase chain reaction method to detect knockdown resistance mutations in Anopheles gambiae. J Med Entomol **45:** 237-241.

JULVEZ, J., M. DEVELOUX, A. MOUNKAILA and J. MOUCHET, 1992 [Diversity of malaria in the Sahelo-Saharan region. A review apropos of the status in Niger, West Africa]. Ann Soc Belg Med Trop **72:** 163-177.

JULVEZ, J., J. MOUCHET, A. MICHAULT, A. FOUTA and M. HAMIDINE, 1997a [Eco-epidemiology of malaria in Niamey and in the river valley, the Republic of Niger, 1992-1995]. Bull Soc Pathol Exot **90:** 94-100.

JULVEZ, J., J. MOUCHET, A. MICHAULT, A. FOUTA and M. HAMIDINE, 1997b [The progress of malaria in sahelian eastern Niger. An ecological disaster zone]. Bull Soc Pathol Exot **90:** 101-104.

JULVEZ, J., J. MOUCHET, J. SUZZONI, G. LARROUY, A. FOUTA *et al.*, 1998 [The anopheles of Niger]. Bull Soc Pathol Exot **91:** 321-326.

KAMAU, L., W. R. MUKABANA, W. A. HAWLEY, T. LEHMANN, L. W. IRUNGU *et al.*, 1999 Analysis of genetic variability in Anopheles arabiensis and Anopheles gambiae using microsatellite loci. Insect Mol Biol **8:** 287-297.

KAWECKI, T. K., 2008 Adaptation to marginal habitats. Annu Rev Ecol Evol Syst **39:** 321-342.

KAYONDO, J. K., L. G. MUKWAYA, A. STUMP, A. P. MICHEL, M. B. COULIBALY *et al.*, 2005 Genetic structure of Anopheles gambiae populations on islands in northwestern Lake Victoria, Uganda. Malar J **4:** 59.

KEISER, J., B. H. SINGER and J. UTZINGER, 2005 Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. Lancet Infect Dis **5:** 695-708.
KELLY-HOPE, L., H. RANSON and J. HEMINGWAY, 2008 Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. Lancet Infect Dis **8:** 387-389.
KELLY-HOPE, L. A., and F. ELLIS MCKENZIE, 2009 The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. Malar J **8:** 19.
KENT, R. J., S. MHARAKURWA and D. E. NORRIS, 2007 Spatial and temporal genetic structure of Anopheles arabiensis in Southern Zambia over consecutive wet and drought years. Am J Trop Med Hyg **77:** 316-323.
KILIAN, A., W. BYAMUKAMA, O. PIGEON, F. ATIELI, S. DUCHON *et al.*, 2008 Long-term field performance of a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in rural Uganda. Malar J **7:** 49.
KILLEEN, G. F., F. E. MCKENZIE, B. D. FOY, C. BOGH and J. C. BEIER, 2001 The availability of potential hosts as a determinant of feeding behaviours and malaria transmission by African mosquito populations. Trans R Soc Trop Med Hyg **95:** 469-476.
KILLEEN, G. F., T. A. SMITH, H. M. FERGUSON, H. MSHINDA, S. ABDULLA *et al.*, 2007 Preventing childhood malaria in Africa by protecting adults from mosquitoes with insecticide-treated nets. PLoS Med **4:** e229.
KIRBY, M. J., D. AMEH, C. BOTTOMLEY, C. GREEN, M. JAWARA *et al.*, 2009 Effect of two different house screening interventions on exposure to malaria vectors and on anaemia in children in The Gambia: a randomised controlled trial. Lancet **374:** 998-1009.
KIRBY, M. J., and S. W. LINDSAY, 2009 Effect of temperature and inter-specific competition on the development and survival of Anopheles gambiae sensu stricto and An. arabiensis larvae. Acta Trop **109:** 118-123.
KLEINSCHMIDT, I., C. SCHWABE, L. BENAVENTE, M. TORREZ, F. C. RIDL *et al.*, 2009 Marked Increase in Child Survival after Four Years of Intensive Malaria Control. Am J Trop Med Hyg **80:** 882-888.
KNOLS, B. G., T. BUKHARI and M. FARENHORST, 2010 Entomopathogenic fungi as the next-generation control agents against malaria mosquitoes. Future Microbiol **5:** 339-341.
KNOLS, B. G. J., and W. TAKKEN, 1998 The wide-scale use of impregnated bednets for malaria control in Africa: impact on mosquitoes. Proc Exp Appl Entomol **8:** 15-20.
KOLACZINSKI, J. H., C. FANELLO, J. P. HERVE, D. J. CONWAY, P. CARNEVALE *et al.*, 2000 Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. Bull Entomol Res **90:** 125-132.
KORENROMP, E. L., J. MILLER, R. E. CIBULSKIS, M. K. CHAM, D. ALNWICK *et al.*, 2003 Monitoring mosquito net coverage for malaria control in Africa: possession vs. use by children under 5 years. Trop Med Int Health **8:** 693-703.
KRAFSUR, E. S., and J. C. ARMSTRONG, 1978 An integrated view of entomological and parasitological observations on falciparum malaria in Gambela, Western Ethiopian Lowlands. Trans R Soc Trop Med Hyg **72:** 348-356.
KRISTAN, M., H. FLEISCHMANN, A. DELLA TORRE, A. STICH and C. F. CURTIS, 2003 Pyrethroid resistance/susceptibility and differential urban/rural distribution of Anopheles arabiensis and An. gambiae s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana. Med Vet Entomol **17:** 326-332.
KULKARNI, M. A., R. MALIMA, F. W. MOSHA, S. MSANGI, E. MREMA *et al.*, 2007 Efficacy of pyrethroid-treated nets against malaria vectors and nuisance-biting mosquitoes in Tanzania in areas with long-term insecticide-treated net use. Trop Med Int Health **12:** 1061-1073.
KULKARNI, M. A., M. ROWLAND, M. ALIFRANGIS, F. W. MOSHA, J. MATOWO *et al.*, 2006 Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (kdr) mutation in

Anopheles arabiensis populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. Malar J **5:** 56.
LABBO, R., C. CZEHER, A. DJIBRILLA, I. ARZIKA, I. JEANNE *et al.*, 2009 Anopheles hervyi in Niger: no evidence for a role in Plasmodium falciparum transmission. Med Vet Entomol **early online publication**.
LABBO, R., C. CZEHER, A. DJIBRILLA, I. ARZIKA, I. JEANNE *et al.*, 2010 Anopheles hervyi in Niger: no evidence for a role in Plasmodium falciparum transmission. Med Vet Entomol **24:** 62-65.
LABBO, R., A. FOUTA, I. JEANNE, I. OUSMANE and J. B. DUCHEMIN, 2004 Anopheles funestus in Sahel: new evidence from Niger. Lancet **363:** 660.
LACEY, L. A., and A. H. UNDEEN, 1986 Microbial control of black flies ans mosquitoes. Annu Rev Entomol **31:** 265-296.
LANZARO, G. C., Y. T. TOURE, J. CARNAHAN, L. ZHENG, G. DOLO *et al.*, 1998 Complexities in the genetic structure of Anopheles gambiae populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. Proc Natl Acad Sci U S A **95:** 14260-14265.
LEBEL, T., A. DIEDHIOU and H. LAURENT, 2003 Seasonal cycle and interannual variability of the sahelian rainfall at hydrological scales. J Geophys Res **108:** 8389.
LEFEVRE, T., L. C. GOUAGNA, K. R. DABIRE, E. ELGUERO, D. FONTENILLE *et al.*, 2009 Evolutionary lability of odour-mediated host preference by the malaria vector Anopheles gambiae. Trop Med Int Health **14:** 228-236.
LEGNER, E. F., 1995 Biological control of Diptera of medical and veterinary importance. J Vector Ecol **20:** 59-120.
LEHMANN, T., and A. DIABATE, 2008 The molecular forms of Anopheles gambiae: a phenotypic perspective. Infect Genet Evol **8:** 737-746.
LEHMANN, T., W. A. HAWLEY, H. GREBERT and F. H. COLLINS, 1998 The effective population size of Anopheles gambiae in Kenya: implications for population structure. Mol Biol Evol **15:** 264-276.
LEHMANN, T., W. A. HAWLEY, H. GREBERT, M. DANGA, F. ATIELI *et al.*, 1999 The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for Anopheles gambiae in Kenya. J Hered **90:** 613-621.
LEHMANN, T., W. A. HAWLEY, L. KAMAU, D. FONTENILLE, F. SIMARD *et al.*, 1996 Genetic differentiation of Anopheles gambiae populations from East and west Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. Heredity **77 (Pt 2):** 192-200.
LEHMANN, T., M. LICHT, N. ELISSA, B. T. MAEGA, J. M. CHIMUMBWA *et al.*, 2003 Population Structure of Anopheles gambiae in Africa. J Hered **94:** 133-147.
LENGELER, C., M. GRABOWSKY, D. MCGUIRE and D. DESAVIGNY, 2007 Quick wins versus sustainability: options for the upscaling of insecticide-treated nets. Am J Trop Med Hyg **77:** 222-226.
LENGELER, C., and R. W. SNOW, 1996 From efficacy to effectiveness: insecticide-treated bednets in Africa. Bull World Health Organ **74:** 325-332.
LEVINE, R. S., A. T. PETERSON and M. Q. BENEDICT, 2004 Geographic and ecologic distributions of the Anopheles gambiae complex predicted using a genetic algorithm. Am J Trop Med Hyg **70:** 105-109.
LINDBLADE, K. A., E. DOTSON, W. A. HAWLEY, N. BAYOH, J. WILLIAMSON *et al.*, 2005 Evaluation of long-lasting insecticidal nets after 2 years of household use. Trop Med Int Health **10:** 1141-1150.
LINDBLADE, K. A., J. E. GIMNIG, L. KAMAU, W. A. HAWLEY, F. ODHIAMBO *et al.*, 2006 Impact of sustained use of insecticide-treated bednets on malaria vector species distribution and culicine mosquitoes. J Med Entomol **43:** 428-432.
LINDSAY, S. W., P. L. ALONSO, J. R. ARMSTRONG SCHELLENBERG, J. HEMINGWAY, J. H. ADIAMAH *et al.*, 1993 A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, west Africa. 7. Impact of permethrin-impregnated bed nets on malaria vectors. Trans R Soc Trop Med Hyg **87 Suppl 2:** 45-51.

LINDSAY, S. W., P. M. EMERSON and J. D. CHARLWOOD, 2002 Reducing malaria by mosquito-proofing houses. Trends Parasitol **18:** 510-514.
LINDSAY, S. W., and M. E. GIBSON, 1988 Bednets Revisited - Old Idea, New Angle. Parasitol Today **4:** 270-272.
LINDSAY, S. W., F. C. SHENTON, R. W. SNOW and B. M. GREENWOOD, 1989a Responses of Anopheles gambiae complex mosquitoes to the use of untreated bednets in The Gambia. Med Vet Entomol **3:** 253-262.
LINDSAY, S. W., R. W. SNOW, G. I. BROOMFIELD, M. S. JANNEH, R. A. WIRTZ *et al.*, 1989b Impact of permethrin treated bednets on malaria transmission by the Anopheles gambiae complex in the Gambia. Med Vet Entomol **3:** 263-271.
LINDSAY, S. W., R. W. SNOW, G. L. BROOMFIELD, M. S. JANNEH, R. A. WIRTZ *et al.*, 1989c Impact of permethrin-treated bednets on malaria transmission by the Anopheles gambiae complex in The Gambia. Med Vet Entomol **3:** 263-271.
LINDSAY, S. W., H. A. WILKINS, H. A. ZIELER, R. J. DALY, V. PETRARCA *et al.*, 1991 Ability of Anopheles gambiae mosquitoes to transmit malaria during the dry and wet seasons in an area of irrigated rice cultivation in The Gambia. J Trop Med Hyg **94:** 313-324.
LINES, J. D., J. MYAMBA and C. F. CURTIS, 1987 Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and eave curtains against malaria vectors in Tanzania. Med Vet Entomol **1:** 37-51.
LOEWENBERG, S., 2006 Niger welcomes largest bednet distribution in history. Lancet **367:** 1473.
LUND, A. E., and T. NARAHASHI, 1983 Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroid and DDT analogs. Pestic Biochem Physiol **20:** 203-216.
LYIMO, I. N., and H. M. FERGUSON, 2009 Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. Trends Parasitol **25:** 189-196.
MAGESA, S. M., T. J. WILKES, A. E. P. MNZAVA, K. J. NJUNWA and J. MYAMBA, 1991 Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria. Part 2. Effects on the malaria vector population. Acta Trop **49:** 97-108.
MAHANDE, A. M., F. MOSHA, J. MAHANDE and E. KWEKA, 2007 Feeding and resting behaviour of malaria vector, Anopheles arabiensis with reference to zooprophylaxis. Malar J **6:** 100.
MAHE, G., Y. L'HOTE, J. C. OLIVRY and G. WOTLING, 2001 Trends and discontinuities in regional rainfall of West and Central Africa: 1951-1989. Hydrol. Sci. J. **46:** 211-226.
MAHON, R. J., C. A. GREEN and R. H. HUNT, 1976 Diagnostic allozymes for routine identification od adults of the Anopheles gambiae complex (Diptera, Culicidae). Bull Entomol Res **66:** 25-31.
MALIMA, R. C., S. M. MAGESA, P. K. TUNGU, V. MWINGIRA, F. S. MAGOGO *et al.*, 2008 An experimental hut evaluation of Olyset nets against anopheline mosquitoes after seven years use in Tanzanian villages. Malar J **7:** 38.
MARA/ARMA, 1999 Vers un Atlas du Risque de la Malaria en Afrique, Premier rapport technique de la collaboration MARA/ARMA. Durban.
MARTINEZ-TORRES, D., F. CHANDRE, M. S. WILLIAMSON, F. DARRIET, J. B. BERGE *et al.*, 1998 Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. Insect Mol Biol **7:** 179-184.
MATTHEWS, S. D., L. J. MEEHAN, D. Y. ONYABE, J. VINEIS, I. NOCK *et al.*, 2007 Evidence for late Pleistocene population expansion of the malarial mosquitoes, Anopheles arabiensis and Anopheles gambiae in Nigeria. Med Vet Entomol **21:** 358-369.
MAXWELL, C. A., W. CHAMBO, M. MWAIMU, F. MAGOGO, I. A. CARNEIRO *et al.*, 2003 Variation of malaria transmission and morbidity with altitude in Tanzania and with introduction of alphacypermethrin treated nets. Malar J **2:** 28.
MAXWELL, C. A., E. MSUYA, M. SUDI, K. J. NJUNWA, I. A. CARNEIRO *et al.*, 2002 Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. Trop Med Int Health **7:** 1003-1008.

MBOGO, C. N., N. M. BAYA, A. V. OFULLA, J. I. GITHURE and R. W. SNOW, 1996a The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. Med Vet Entomol **10:** 251-259.
MBOGO, C. N. M., N. M. BAYA, A. V. O. OFULLA, J. I. GITHURE and R. W. SNOW, 1996b The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. Annu Rev Entomol **10:** 251-259.
METSELAAR, D., and P. H. VAN THIEL, 1959 Classification of malaria. Trop Geogr Med **11:** 157-161.
MILLER, J. E., S. W. LINDSAY and J. R. ARMSTRONG, 1991 Experimental hut trials of bednets impregnated with synthetic pyrethroid or organophosphate insecticide for mosquito control in The Gambia. Med Vet Entomol **5:** 465-476.
MIREJI, P. O., J. KEATING, A. HASSANALI, C. M. MBOGO, H. NYAMBAKA *et al.*, 2008 Heavy metals in mosquito larval habitats in urban Kisumu and Malindi, Kenya, and their impact. Ecotoxicol Environ Saf **70:** 147-153.
MOLINEAUX, L., and G. GRAMICCIA, 1980 Le Projet Garki. Recherches sur l'épidémiologie du paludisme et la lutte antipaludique dans la savane soudanienne de l'Afrique occidentale. World Health Organization, Geneva.
MOORES, G., and G. BINGHAM, 2005 Use of "temporal synergism" to overcome insecticide resistance. Outlooks on Pest Management **16:** 7-9.
MORENO, M., P. SALGUEIRO, J. L. VICENTE, J. CANO, P. J. BERZOSA *et al.*, 2007 Genetic population structure of Anopheles gambiae in Equatorial Guinea. Malar J **6:** 137.
MORENO, M., J. L. VICENTE, J. CANO, P. J. BERZOSA, A. DE LUCIO *et al.*, 2008 Knockdown resistance mutations (kdr) and insecticide susceptibility to DDT and pyrethroids in Anopheles gambiae from Equatorial Guinea. Trop Med Int Health **13:** 430-433.
MOSHA, F. W., and V. PETRARCA, 1983 Ecological studies on Anopheles gambiae complex sibling species on the Kenya coast. Trans R Soc Trop Med Hyg **77:** 344-345.
MOUCHET, J., 1988 Agriculture and vector resistance. Insect Sci Appl **9:** 297-302.
MOUCHET, J., P. CARNEVALE, M. COOSEMANS, J. JULVEZ, S. MANGUIN *et al.*, 2004 *Biodiversité du paludisme dans le monde*. John Libbey Eurotext Editions, Montrouge, 428 pp.
MOUCHET, J., O. FAYE, J. JUIVEZ and S. MANGUIN, 1996 Drought and malaria retreat in the Sahel, west Africa. Lancet **348:** 1735-1736.
MUIRHEAD THOMSON, R. C., 1948 Studies on Anopheles gambiae and A. melas in and around Lagos. Bull Entomol Res **38:** 527-558.
MUKABAYIRE, O., J. CARIDI, X. WANG, Y. T. TOURE, M. COLUZZI *et al.*, 2001 Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of Anopheles gambiae: evidence from rDNA and single-copy loci. Insect Mol Biol **10:** 33-46.
MUNHENGA, G., H. T. MASENDU, B. D. BROOKE, R. H. HUNT and L. K. KOEKEMOER, 2008 Pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles arabiensis from Gwave, a malaria-endemic area in Zimbabwe. Malar J **7:** 247.
MURIU, S. M., E. J. MUTURI, J. I. SHILILU, C. M. MBOGO, J. M. MWANGANGI *et al.*, 2008 Host choice and multiple blood feeding behaviour of malaria vectors and other anophelines in Mwea rice scheme, Kenya. Malar J **7:** 43.
MUTERO, C. M., H. BLANK, F. KONRADSEN and W. VAN DER HOEK, 2000 Water management for controlling the breeding of Anopheles mosquitoes in rice irrigation schemes in Kenya. Acta Trop **76:** 253-263.
N'GUESSAN, R., V. CORBEL, M. AKOGBETO and M. ROWLAND, 2007 Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. Emerg Infect Dis **13:** 199-206.
NAJERA, J. A., 1989 Le paludisme et l'action de l'OMS. Bull World Health Organ **67:** 347-363.
NAJERA, J. A., 2001 Malaria control: achievements, problems and strategies. Parassitologia **43:** 1-89.
NDIATH, M. O., C. BRENGUES, L. KONATE, C. SOKHNA, C. BOUDIN *et al.*, 2008 Dynamics of transmission of Plasmodium falciparum by Anopheles arabiensis and the molecular forms M and S of Anopheles gambiae in Dielmo, Senegal. Malar J **7:** 136.

NDJEMAI, H. N., S. PATCHOKE, J. ATANGANA, J. ETANG, F. SIMARD *et al.*, 2009 The distribution of insecticide resistance in Anopheles gambiae s.l. populations from Cameroon: an update. Trans R Soc Trop Med Hyg.

NEI, M., T. MARUYAMA and R. CHAKRABORTY, 1975 The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution **29:** 1-10.

NIARE, O., K. MARKIANOS, J. VOLZ, F. ODUOL, A. TOURE *et al.*, 2002 Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. Science **298:** 213-216.

NJAU, R. J. A., F. W. MOSHA and J. F. M. NGUMA, 1993 Field trials of pyrethroid impregnated bednets in northern Tanzania. 1. Effects on malaria transmission. Insect Sci Appl **5:** 575-584.

NJIE, M., E. DILGER, S. W. LINDSAY and M. J. KIRBY, 2009 Importance of Eaves to House Entry by Anopheline, But Not Culicine, Mosquitoes. J Med Entomol **46:** 505-510.

NOOR, A. M., J. J. MUTHEU, A. J. TATEM, S. I. HAY and R. W. SNOW, 2009 Insecticide-treated net coverage in Africa: mapping progress in 2000-07. Lancet **373:** 58-67.

NYANJOM, S. R., H. CHEN, T. GEBRE-MICHAEL, E. BEKELE, J. SHILILU *et al.*, 2003 Population genetic structure of Anopheles arabiensis mosquitoes in Ethiopia and Eritrea. J Hered **94:** 457-463.

OKELL, L. C., C. J. DRAKELEY, A. C. GHANI, T. BOUSEMA and C. J. SUTHERLAND, 2008 Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: a pooled analysis of six randomized trials. Malar J **7:** 125.

OMER, S. M., and J. L. CLOUDSLEY-THOMPSON, 1970 Survival of female Anopheles gambiae Giles through a 9-Month dry season in Sudan. Bull World Health Organ **42:** 319-330.

ONYABE, D. Y., and J. E. CONN, 2001a The distribution of two major malaria vectors, Anopheles gambiae and Anopheles arabiensis, in Nigeria. Mem Inst Oswaldo Cruz **96:** 1081-1084.

ONYABE, D. Y., and J. E. CONN, 2001b Population genetic structure of the malaria mosquito Anopheles arabiensis across Nigeria suggests range expansion. Mol Ecol **10:** 2577-2591.

ONYABE, D. Y., C. G. VAJIME, I. H. NOCK, I. S. NDAMS, A. U. AKPA *et al.*, 2003 The distribution of M and S molecular forms of Anopheles gambiae in Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg **97:** 605-608.

OTTEN, M., M. AREGAWI, W. WERE, C. KAREMA, A. MEDIN *et al.*, 2009 Initial evidence of reduction of malaria cases and deaths in Rwanda and Ethiopia due to rapid scale-up of malaria prevention and treatment. Malar J **8:** 14.

PASKEWITZ, S. M., and F. H. COLLINS, 1990 Use of the polymerase chain reaction to identify mosquito species of the Anopheles gambiae complex. Med Vet Entomol **4:** 367-373.

PATES, H., and C. CURTIS, 2005 Mosquito behavior and vector control. Annu Rev Entomol **50:** 53-70.

PENNETIER, C., C. COSTANTINI, V. CORBEL, S. LICCIARDI, R. K. DABIRE *et al.*, 2008 Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. Emerg Infect Dis **14:** 1707-1714.

PETRARCA, V., A. D. NUGUD, M. A. AHMED, A. M. HARIDI, M. A. DI DECO *et al.*, 2000 Cytogenetics of the Anopheles gambiae complex in Sudan, with special reference to An. arabiensis: relationships with East and West African populations. Med Vet Entomol **14:** 149-164.

PETRARCA, V., G. SABATINELLI, Y. T. TOURE and M. A. DI DECO, 1998 Morphometric multivariate analysis of field samples of adult Anopheles arabiensis and An. gambiae s.s. (Diptera: Culicidae). J Med Entomol **35:** 16-25.

PINTO, J., A. LYND, N. ELISSA, M. J. DONNELLY, C. COSTA *et al.*, 2006 Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in Anopheles gambiae from Libreville, Gabon. Med Vet Entomol **20:** 27-32.

PINTO, J., A. LYND, J. L. VICENTE, F. SANTOLAMAZZA, N. P. RANDLE *et al.*, 2007 Multiple origins of knockdown resistance mutations in the Afrotropical mosquito vector Anopheles gambiae. PLoS ONE **2:** e1243.

PNLP, 2006 Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2006-2010. Programme National de Lutte contre le Paludisme du Niger, Niamey.
POLLAK, E., 1983 A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. Genetics **104:** 531-548.
PORT, G. R., and P. F. L. BOREHAM, 1982 The effect of bed nets on feeding by Anopheles gambiae Giles (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res **72:** 483-488.
PREMJI, Z., P. LUBEGA, Y. HAMISI, E. MCHOPA, J. MINJAS *et al.*, 1995 Changes in malaria associated morbidity in children using insecticide treated mosquito nets in the Bagamoyo district of coastal Tanzania. Trop Med Parasitol **46:** 147-153.
PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS and P. DONNELLY, 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics **155:** 945-959.
PROTOPOPOFF, N., W. VAN BORTEL, T. MARCOTTY, M. VAN HERP, P. MAES *et al.*, 2007 Spatial targeted vector control in the highlands of Burundi and its impact on malaria transmission. Malar J **6:** 158.
PROTOPOPOFF, N., K. VERHAEGHEN, W. VAN BORTEL, P. ROELANTS, T. MARCOTTY *et al.*, 2008 A significant increase in kdr in Anopheles gambiae is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands. Trop Med Int Health **13:** 1479-1487.
PRUGNOLLE, F., P. DURAND, K. JACOB, F. RAZAKANDRAINIBE, C. ARNATHAU *et al.*, 2008 A comparison of Anopheles gambiae and Plasmodium falciparum genetic structure over space and time. Microbes Infect **10:** 269-275.
QUINONES, M. L., C. J. DRAKELEY, O. MULLER, J. D. LINES, M. HAYWOOD *et al.*, 2000 Diversion of Anopheles gambiae from children to other hosts following exposure to permethrin-treated bednets. Med Vet Entomol **14:** 369-375.
QUINONES, M. L., J. LINES, M. C. THOMSON, M. JAWARA and B. M. GREENWOOD, 1998 Permethrin-treated bed nets do not have a 'mass-killing effect' on village populations of Anopheles gambiae s.l. in The Gambia. Trans R Soc Trop Med Hyg **92:** 373-378.
RABARISON, P., L. RAMAMBANIRINA, S. LAVENTURE, J. P. LEPERS, R. JAMBOU *et al.*, 1997 Impact des rideaux imprégnés de deltaméthrine sur les vecteurs et la morbidité palustre: résultats à Ankazobe, sur les plateaux de Madagascar. Cahiers Santé **7:** 39-45.
RAJAGOPAL, R., 1977 Malathion-resistance in Anopheles culicifacies in Gujarat. Ind J Med Res **66:** 27-28.
RAMPHUL, U., T. BOASE, C. BASS, L. M. OKEDI, M. J. DONNELLY *et al.*, 2009 Insecticide resistance and its association with target-site mutations in natural populations of Anopheles gambiae from eastern Uganda. Trans R Soc Trop Med Hyg **103:** 1121-1126.
RANSON, H., H. ABDALLAH, A. BADOLO, W. M. GUELBEOGO, C. KERAH-HINZOUMBE *et al.*, 2009 Insecticide resistance in Anopheles gambiae: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. Malar J **8:** 299.
RANSON, H., B. JENSEN, J. M. VULULE, X. WANG, J. HEMINGWAY *et al.*, 2000a Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol **9:** 491-497.
RANSON, H., B. JENSEN, X. WANG, L. PRAPANTHADARA, J. HEMINGWAY *et al.*, 2000b Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector Anopheles gambiae. Insect Mol Biol **9:** 499-507.
RANSON, H., M. G. PATON, B. JENSEN, L. MCCARROLL, A. VAUGHAN *et al.*, 2004 Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, Anopheles gambiae. Insect Mol Biol **13:** 379-386.
RAYMOND, M., and F. ROUSSET, 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity **86:** 248-249.
RBM, 2005 The Global Strategic Plan 2005–2015. [http://www.rollbackmalaria.org/forumV/docs/gsp_en.pdf] via the Internet, accessed 2009/03/18.

RBM, 2008 The Global Malaria Action Plan for a Malaria-free World. World Health Organization, Geneva.
READ, A. F., P. A. LYNCH and M. B. THOMAS, 2009 How to Make Evolution-Proof Insecticides for Malaria Control. PLoS Biol **7:** e1000058.
REIMER, L., E. FONDJO, S. PATCHOKE, B. DIALLO, Y. LEE *et al.*, 2008 Relationship between kdr mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of Anopheles gambiae. J Med Entomol **45:** 260-266.
REIMER, L. J., F. TRIPET, M. SLOTMAN, A. SPIELMAN, E. FONDJO *et al.*, 2005 An unusual distribution of the kdr gene among populations of Anopheles gambiae on the island of Bioko, Equatorial Guinea. Insect Mol Biol **14:** 683-688.
RIDL, F. C., C. BASS, M. TORREZ, D. GOVENDER, V. RAMDEEN *et al.*, 2008 A pre-intervention study of malaria vector abundance in Rio Muni, Equatorial Guinea: Their role in malaria transmission and the incidence of insecticide resistance alleles. Malar J **7:** 194.
RIEHLE, M. M., K. MARKIANOS, L. LAMBRECHTS, A. XIA, I. SHARAKHOV *et al.*, 2007 A major genetic locus controlling natural Plasmodium falciparum infection is shared by East and West African Anopheles gambiae. Malar J **6:** 87.
RIEHLE, M. M., K. MARKIANOS, O. NIARE, J. XU, J. LI *et al.*, 2006 Natural malaria infection in Anopheles gambiae is regulated by a single genomic control region. Science **312:** 577-579.
RIOUX, J. A., 1960 Contribution à l'étude des culicidés (Diptera, Culicidae) du Nord-Tchad, pp. 53-92 in *Mission épidémiologique au Nord-Tchad*. Arts & Métiers Graphiques, Etampes.
RITCHIE, S. A., and W. ROCHESTER, 2001 Wind-blown mosquitoes and introduction of japanese encephalitis into Australia. Emerg Infect Dis **7:** 900-903.
ROBERT, V., and P. CARNEVALE, 1991 Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou valley, Burkina Faso. Bull World Health Organ **69:** 735-740.
RODHAIN, F., and C. PEREZ, 1985 *Précis d'Entomologie Médicale et Vétérinaire*. Maloine, Paris, 458 pp.
ROUSSET, F., 2008 GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Mol Ecol Res **8:** 103-106.
SACHS, J., and P. MALANEY, 2002 The economic and social burden of malaria. Nature **415:** 680-685.
SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF and R. HIGUCHI, 1988 Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239:** 487-491.
SANTOLAMAZZA, F., M. CALZETTA, J. ETANG, E. BARRESE, I. DIA *et al.*, 2008 Distribution of knock-down resistance mutations in Anopheles gambiae molecular forms in west and west-central Africa. Malar J **7:** 74.
SANTOLAMAZZA, F., A. DELLA TORRE and A. CACCONE, 2004 Short report: A new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to identify Anopheles arabiensis from An. gambiae and its two molecular forms from degraded DNA templates or museum samples. Am J Trop Med Hyg **70:** 604-606.
SATTELLE, D. B., and D. YAMAMOTO, 1988 Molecular targets of pyrethroid insecticides. Adv Insect Physiol **20:** 147-213.
SATTLER, M. A., D. MTASIWA, M. KIAMA, Z. PREMJI, M. TANNER *et al.*, 2005 Habitat characterization and spatial distribution of Anopheles sp. mosquito larvae in Dar es Salaam (Tanzania) during an extended dry period. Malar J **4:** 4.
SAUL, A., 2007 Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. Curr Opin Infect Dis **20:** 476-481.
SCHELLENBERG, J. R., S. ABDULLA, R. NATHAN, O. MUKASA, T. J. MARCHANT *et al.*, 2001 Effect of large-scale social marketing of insecticide-treated nets on child survival in rural Tanzania. Lancet **357:** 1241-1247.
SCHLUTER, D., 2001 Ecology and the origin of species. Trends Ecol Evol **16:** 372-380.

SCHOLTE, E. J., B. G. KNOLS, R. A. SAMSON and W. TAKKEN, 2004 Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. J Insect Sci **4:** 19.
SCHOLTE, E. J., B. G. KNOLS and W. TAKKEN, 2006 Infection of the malaria mosquito Anopheles gambiae with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae reduces blood feeding and fecundity. J Invertebr Pathol **91:** 43-49.
SCHOLTE, E. J., K. NG'HABI, J. KIHONDA, W. TAKKEN, K. PAAIJMANS *et al.*, 2005 An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. Science **308:** 1641-1642.
SCHUG, M. D., C. M. HUTTER, K. A. WETTERSTRAND, M. S. GAUDETTE, T. F. C. MACKAY *et al.*, 1998 The Mutation Rates of Di-, Tri- and Tetranucleotide Repeats in Drosophila melanogaster. Mol Biol Evol **15:** 1751-1760.
SCOTT, J. A., W. H. BRODGON and F. H. COLLINS, 1993 Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg **49:** 520-529.
SERVICE, M. W., 1997 Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal-The long and short of it. J Med Entomol **34:** 579-588.
SEXTON, J. D., T. K. RUEBUSH, 2ND, A. D. BRANDLING-BENNETT, J. G. BREMAN, J. M. ROBERTS *et al.*, 1990 Permethrin-impregnated curtains and bed-nets prevent malaria in western Kenya. Am J Trop Med Hyg **43:** 11-18.
SHARAKHOV, I. V., B. J. WHITE, M. V. SHARAKHOVA, J. KAYONDO, N. F. LOBO *et al.*, 2006 Breakpoint structure reveals the unique origin of an interspecific chromosomal inversion (2La) in the Anopheles gambiae complex. Proc Natl Acad Sci U S A **103:** 6258-6262.
SHARP, B. L., I. KLEINSCHMIDT, E. STREAT, R. MAHARAJ, K. I. BARNES *et al.*, 2007a Seven years of regional malaria control collaboration--Mozambique, South Africa, and Swaziland. Am J Trop Med Hyg **76:** 42-47.
SHARP, B. L., F. C. RIDL, D. GOVENDER, J. KUKLINSKI and I. KLEINSCHMIDT, 2007b Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. Malar J **6:** 52.
SIMARD, F., D. FONTENILLE, T. LEHMANN, R. GIROD, L. BRUTUS *et al.*, 1999 High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector Anopheles arabiensis from West Africa and eastern outer islands. Am J Trop Med Hyg **60:** 1000-1009.
SIMARD, F., T. LEHMANN, J. J. LEMASSON, M. DIATTA and D. FONTENILLE, 2000 Persistence of Anopheles arabiensis during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. Insect Mol Biol **9:** 467-479.
SLOTMAN, M. A., F. TRIPET, A. J. CORNEL, C. R. MENESES, Y. LEE *et al.*, 2007 Evidence for subdivision within the M molecular form of Anopheles gambiae. Mol Ecol **16:** 639-649.
SMITH, A., and P. L. CHABEDA, 1968 A verandah-trap hut for studying the house-frequenting habits of mosquitoes and for assessing insecticides. IV. The effect of tetramethrin on the behaviour and mortality of Anopheles gambiae Giles. Bull Entomol Res **59:** 457-463.
SMITH, D. L., J. DUSHOFF, R. W. SNOW and S. I. HAY, 2005 The entomological inoculation rate and Plasmodium falciparum infection in African children. Nature **438:** 492-495.
SMITH, S. C., U. B. JOSHI, M. GRABOWSKY, J. SELANIKIO, T. NOBIYA *et al.*, 2007 Evaluation of bednets after 38 months of household use in northwest Ghana. Am J Trop Med Hyg **77:** 243-248.
SMITH, T. A., R. LEUENBERGER and C. LENGELER, 2001 Child mortality and malaria transmission intensity in Africa. Trends Parasitol **17:** 145-149.
SNOW, R. W., S. W. LINDSAY, R. J. HAYES and B. M. GREENWOOD, 1988a Permethrin-treated bed nets (mosquito nets) prevent malaria in Gambian children. Trans R Soc Trop Med Hyg **82:** 838-842.

SNOW, R. W., K. M. ROWAN, S. W. LINDSAY and B. M. GREENWOOD, 1988b A trial of bed nets (mosquito nets) as a malaria control strategy in a rural area of The Gambia, West Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg **82:** 212-215.

SOGOBA, N., P. VOUNATSOU, M. M. BAGAYOKO, S. DOUMBIA, G. DOLO *et al.*, 2008 Spatial distribution of the chromosomal forms of anopheles gambiae in Mali. Malar J **7:** 205.

SOREMEKUN, S., C. MAXWELL, M. ZUWAKUU, C. CHEN, E. MICHAEL *et al.*, 2004 Measuring the efficacy of insecticide treated bednets: the use of DNA fingerprinting to increase the accuracy of personal protection estimates in Tanzania. Trop Med Int Health **9:** 664-672.

STAFFORD SMITH, D. M., 1981 Mosquito records from the Republic of Niger, with reference to the construction of the new 'Trans-Sahara Highway'. J Trop Med Hyg **84:** 95-100.

STUMP, A. D., F. K. ATIELI, J. M. VULULE and N. J. BESANSKY, 2004 Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of Anopheles gambiae in response to insecticide-treated bed net trials. Am J Trop Med Hyg **70:** 591-596.

STUMP, A. D., M. C. FITZPATRICK, N. F. LOBO, S. TRAORE, N. SAGNON *et al.*, 2005a Centromere-proximal differentiation and speciation in Anopheles gambiae. Proc Natl Acad Sci U S A **102:** 15930-15935.

STUMP, A. D., J. A. SHOENER, C. COSTANTINI, N. SAGNON and N. J. BESANSKY, 2005b Sex-linked differentiation between incipient species of Anopheles gambiae. Genetics **169:** 1509-1519.

TAKKEN, W., F. BALK, R. C. JANSEN and J. H. KOEMAN, 1978 The experimental application of insecticides from a helicopter for the control of riverine populations of Glossina tachinoides in West Africa. VI. Obserbations on side effects. PANS **24:** 455-466.

TAMI, A., G. MUBYAZI, A. TALBERT, H. MSHINDA, S. DUCHON *et al.*, 2004 Evaluation of Olyset insecticide-treated nets distributed seven years previously in Tanzania. Malar J **3:** 19.

TAYLOR, C. E., Y. T. TOURE, M. COLUZZI and V. PETRARCA, 1993 Effective population size and persistence of Anopheles arabiensis during the dry season in west Africa. Med Vet Entomol **7:** 351-357.

TEMU, E. A., and G. YAN, 2005 Microsatellite and mitochondrial genetic differentiation of Anopheles arabiensis (Diptera: Culicidae) from western Kenya, the Great Rift Valley, and coastal Kenya. Am J Trop Med Hyg **73:** 726-733.

TER KUILE, F. O., D. J. TERLOUW, P. A. PHILLIPS-HOWARD, W. A. HAWLEY, J. F. FRIEDMAN *et al.*, 2003 Impact of permethrin-treated bed nets on malaria and all-cause morbidity in young children in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya: cross-sectional survey. Am J Trop Med Hyg **68:** 100-107.

THANG, N. D., A. ERHART, N. SPEYBROECK, N. X. XA, N. N. THANH *et al.*, 2009 Long-Lasting Insecticidal Hammocks for controlling forest malaria: a community-based trial in a rural area of central Vietnam. PLoS One **4:** e7369.

THOMSON, M. C., S. J. CONNOR, M. L. QUINONES, M. JAWARA, J. TODD *et al.*, 1995 Movement of Anopheles gambiae s.l. malaria vectors between villages in The Gambia. Med Vet Entomol **9:** 413-419.

THWING, J., N. HOCHBERG, J. VANDEN ENG, S. ISSIFI, M. J. ELIADES *et al.*, 2008 Insecticide-treated net ownership and usage in Niger after a nationwide integrated campaign. Trop Med Int Health **13:** 827-834.

TIA, E., M. AKOGBETO, A. KOFFI, M. TOURE, A. M. ADJA *et al.*, 2006 [Pyrethroid and DDT resistance of Anopheles gambiae s.s. (Diptera: Culicidae) in five agricultural ecosystems from Cote-d'Ivoire]. Bull Soc Pathol Exot **99:** 278-282.

TOURE, M., J. D. ETANG, P. CARNEVALE and F. CHANDRE, 2007 Effectiveness of Permanet in Côte d'Ivoire Rural Areas and Residual Activity on a Knockdown-Resistant Strain of Anopheles gambiae. J Med Entomol **44:** 498-502.

TOURE, Y. T., G. DOLO, V. PETRARCA, S. F. TRAORE, M. BOUARE *et al.*, 1998a Mark-release-recapture experiments with Anopheles gambiae s.l. in Banambani Village, Mali, to determine population size and structure. Med Vet Entomol **12:** 74-83.

TOURE, Y. T., V. PETRARCA and M. COLUZZI, 1983 Nuove entita del complesso Anopheles gambiae in Mali. Parassitologia **25:** 367-370.
TOURE, Y. T., V. PETRARCA, S. F. TRAORE, A. COULIBALY, H. M. MAIGA *et al.*, 1998b The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa. Parassitologia **40:** 477-511.
TRIPET, F., Y. T. TOURE, G. DOLO and G. C. LANZARO, 2003 Frequency of multiple inseminations in field-collected Anopheles gambiae females revealed by DNA analysis of transferred sperm. Am J Trop Med Hyg **68:** 1-5.
TRIPET, F., J. WRIGHT, A. CORNEL, A. FOFANA, R. MCABEE *et al.*, 2007 Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of Anopheles gambiae s.s. Am J Trop Med Hyg **76:** 81-87.
TRIPET, F., J. WRIGHT and G. LANZARO, 2006 A new high-performance PCR diagnostic for the detection of pyrethroid knockdown resistance kdr in Anopheles gambiae. Am J Trop Med Hyg **74:** 658-662.
TURNER, T. L., and M. W. HAHN, 2007 Locus- and population-specific selection and differentiation between incipient species of Anopheles gambiae. Mol Biol Evol **24:** 2132-2138.
TURNER, T. L., M. W. HAHN and S. V. NUZHDIN, 2005 Genomic islands of speciation in Anopheles gambiae. PLoS Biol **3:** e285.
UNDP, 2007 The Millennium Development Goals Report 2007. United Nations, New York.
VAIS, H., M. S. WILLIAMSON, A. L. DEVONSHIRE and P. N. R. USHERWOOD, 2001 The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. Pest Manag Sci **57:** 877-888.
VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS and P. SHIPLEY, 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes **4:** 535-538.
VERHAEGHEN, K., W. VAN BORTEL, P. ROELANTS, T. BACKELJAU and M. COOSEMANS, 2006 Detection of the East and West African kdr mutation in Anopheles gambiae and Anopheles arabiensis from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. Malar J **5:** 16.
VULULE, J. M., R. F. BEACH, F. K. ATIELI, D. L. MOUNT, J. M. ROBERTS *et al.*, 1996 Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase Anopheles gambiae permethrin tolerance. Med Vet Entomol **10:** 71-79.
VULULE, J. M., R. F. BEACH, F. K. ATIELI, J. M. ROBERTS, D. L. MOUNT *et al.*, 1994 Reduced susceptibility of Anopheles gambiae to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. Med Vet Entomol **8:** 71-75.
WANG-SATTLER, R., S. BLANDIN, Y. NING, C. BLASS, G. DOLO *et al.*, 2007 Mosaic genome architecture of the Anopheles gambiae species complex. PLoS ONE **2:** e1249.
WANG, R., F. C. KAFATOS and L. ZHENG, 1999 Microsatellite markers and genotyping procedures for Anopheles gambiae. Parasitol Today **15:** 33-37.
WANG, R., L. ZHENG, Y. T. TOURE, T. DANDEKAR and F. C. KAFATOS, 2001 When genetic distance matters: measuring genetic differentiation at microsatellite loci in whole-genome scans of recent and incipient mosquito species. Proc Natl Acad Sci U S A **98:** 10769-10774.
WAPLES, R. S., 1989 A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. Genetics **121:** 379-391.
WEBER, J. L., and C. WONG, 1993 Mutation of human short tandem repeats. Hum Mol Genet **2:** 1123-1128.
WEILL, M., F. CHANDRE, C. BRENGUES, S. MANGUIN, M. AKOGBETO *et al.*, 2000 The kdr mutation occurs in the Mopti form of Anopheles gambiae s.s. through introgression. Insect Mol Biol **9:** 451-455.
WEIR, B. S., and C. C. COCKERHAM, 1984 Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. Evolution **38:** 1358-1370.

WHITE, B. J., F. SANTOLAMAZZA, L. KAMAU, M. POMBI, O. GRUSHKO *et al.*, 2007 Molecular karyotyping of the 2La inversion in Anopheles gambiae. Am J Trop Med Hyg **76:** 334-339.
WHITE, G. B., 1970a Chromosomal evidence for natural interspecific hybridization by mosquitoes of the Anopheles gambiae complex. Nature **231:** 184-185.
WHITE, G. B., 1970b Evidence for Anopheles squamosus migration? Nature **227:** 739-740.
WHITE, G. B., 1973 The Anopheles gambiae complex and malaria transmission around Kisumu, Kenya. Trans R Soc Trop Med Hyg **66:** 572-581.
WHITE, G. B., 1974 Anopheles gambiae complex and disease transmission in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg **68:** 278-301.
WHITE, G. B., and P. ROSEN, 1973 Comparative studies on sibling species of the Anopheles gambiae Giles complex (Diptera: Culicidae). II. Ecology of species A and B in savanna around Kaduna, Nigeria during transition from wet to dry season. Bull Entomol Res **62:** 613-625.
WHO, 1991 Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors. TDR/BCV/MAL-ENT/91.3, World Health Organization, Geneva.
WHO, 1998 Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bioefficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Report of the WHO Informal Consultation. WHO/MAL/98.12, World Health Organization, Geneva.
WHO, 1999 The impact of permethrin and deltamethrin resistance in Anopheles gambiae s.s. on the efficacy of insecticide-treated mosquito nets. WHO/MAL/99.1088, World Health Organization, Geneva.
WHO, 2000 The African Summit on Roll Back Malaria, Abuja, 25 April 2000. WHO/CDS/RBM/2000.17, World Health Organization, Geneva.
WHO, 2003 The Africa Malaria Report, 2003. WHO/CDS/MAL/2003.1093, World Health Organization, Geneva.
WHO, 2005 Stratégies de subvention ciblées pour des programmes de moustiquaires imprégnées d'insecticide à l'échelle nationale - Principes et méthodes. WHO/HTM/MAL/2005.1104, World Health Organization, Geneva.
WHO, 2006 Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance, Sixth edition. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1, Geneva.
WHO, 2007 WHO recommended insecticide products treatment of mosquito nets for malaria vector control, Updated december 2007. [www.who.int] via the Internet, accessed 24/07/2009.
WHO, 2008a The Global Burden of Disease: 2004 Update. World Health Organization, Geneva.
WHO, 2008b Global malaria control and elimination: report of a technical review. World Health Organization, Geneva.
WHO, 2008c World Malaria Report 2008. WHO/HTM/GMP/2008.1, World Health Organization, Geneva.
WHO, 2009a WHO recommended long-lasting insecticidal mosquito nets, updated january 2009. [www.who.int] via the Internet, accessed 24/07/2009.
WHO, 2009b World Malaria Report 2009. World Health Organization, Geneva.
WIRTZ, R. A., T. R. BURKOT, P. M. GRAVES and R. G. ANDRE, 1987 Field evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assays for Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J Med Entomol **24:** 433-437.
WONDJI, C., S. FREDERIC, V. PETRARCA, J. ETANG, F. SANTOLAMAZZA *et al.*, 2005a Species and populations of the Anopheles gambiae complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of Anopheles gambiae s.s. J Med Entomol **42:** 998-1005.
WONDJI, C., F. SIMARD and D. FONTENILLE, 2002 Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of Anopheles gambiae in an area of sympatry. Insect Mol Biol **11:** 11-19.

WONDJI, C., F. SIMARD, T. LEHMANN, E. FONDJO, A. SAME-EKOBO *et al.*, 2005b Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of Anopheles arabiensis in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. Mol Ecol **14:** 3683-3693.

WRIGHT, S., 1978 Variability among and within populations in *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press.

YADOULETON, A. W., A. ASIDI, R. F. DJOUAKA, J. BRAIMA, C. D. AGOSSOU *et al.*, 2009 Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of Anopheles gambiae in urban areas of Benin. Malar J **8:** 103.

YAKOB, L., and G. YAN, 2009 Modeling the Effects of Integrating Larval Habitat Source Reduction and Insecticide Treated Nets for Malaria Control. PLoS ONE **4:** e6921.

YAWSON, A. E., P. J. MCCALL, M. D. WILSON and M. J. DONNELLY, 2004 Species abundance and insecticide resistance of Anopheles gambiae in selected areas of Ghana and Burkina Faso. Med Vet Entomol **18:** 372-377.

YAWSON, A. E., D. WEETMAN, M. D. WILSON and M. J. DONNELLY, 2007 Ecological zones rather than molecular forms predict genetic differentiation in the malaria vector Anopheles gambiae s.s. in Ghana. Genetics **175:** 751-761.

YOUNG, S. J., R. V. GUNNING and G. D. MOORES, 2005 The effect of PBO on pyrethroid-resistance-associated esterases in Helicoverpa armigera (Hubner) Lepidoptera: Noctuidae. Pest Manag Sci **61:** 397-401.

ZAIM, M., A. AITIO and N. NAKASHIMA, 2000 Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med Vet Entomol **14:** 1-5.

ZHENG, L., M. Q. BENEDICT, A. J. CORNEL, F. H. COLLINS and F. C. KAFATOS, 1996a An integrated genetic map of the african human malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. Genetics **143:** 941-952.

ZHENG, L., M. Q. BENEDICT, A. J. CORNEL, F. H. COLLINS and F. C. KAFATOS, 1996b An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. Genetics **143:** 941-952.

ZHENG, L., A. J. CORNEL, R. WANG, H. ERFLE, H. VOSS *et al.*, 1997 Quantitative trait loci for refractoriness of Anopheles gambiae to Plasmodium cynomolgi B. Science **276:** 425-428.

Liste des figures

Figure 1. Cycle parasitaire des quatre espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'homme.
Figure 2. Modèle climatique d'adéquation à la transmission stable du paludisme.
Figure 3. Incidence estimée du paludisme dans le monde en 2006.
Figure 4. Nombre de cas de paludisme estimés en 2006 dans les 19 pays africains les plus touchés.
Figure 5. Représentation schématique de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant, cible des insecticides pyréthrinoïdes et du DDT.
Figure 6. Distribution des mutations *kdr-e* (1014S) et *kdr-w* (1014F) dans les populations des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s.
Figure 7. Distribution des espèces du complexe *An. gambiae* en Afrique.
Figure 8. Représentation des inversions de l'hémi-chromosome 2R fréquemment observées chez les espèces du complexe *An. gambiae.*
Figure 9. Schéma de la structure de l'ADN ribosomal chez *An. gambiae.*
Figure 10. Représentation schématique des aires de distribution des formes moléculaires et chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. en Afrique sub-Saharienne.
Figure 11. Carte du Niger indiquant les pays frontaliers, les sept régions administratives, les principales villes, ainsi que le réseau hydrographique.
Figure 12. Les zones éco-climatiques du Niger.
Figure 13. Estimation de la densité des populations humaines au Niger en 1995.
Figure 14. Localisation des sites d'étude.
Figure 15. Plan d'échantillonnage du suivi entomologique transversal, de mi 2005 à fin 2007.
Figure 16. Exemple de migration électrophorétique de produits d'amplification de la PCR de détection des allèles *kds* et *kdr* au niveau du canal sodium d'*An. gambiae.*
Figure 17. Schéma des chromosomes d'*An. gambiae* s.l. indiquant la position des marqueurs microsatellites sélectionnés pour l'étude des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis.*
Figure 18. Proportions relatives de femelles des principales espèces collectées par les différentes méthodes, dans les douze sites suivis et toutes périodes condondues.

Figure 19. Moyenne du nombre de femelles *An. gambiae* s.l. collectées dans les douze villages, toutes périodes et années confondues, par méthode de capture.
Figure 20. Variations temporelles de l'abondance d'*An. gambiae* s.l. toutes méthodes de capture confondues (sommes) dans les six villages suivis pendant trois ans.
Figure 21. Abondances d'*An. gambiae* s.l. à Zindarou, estimées par les captures à l'atterrissage ainsi que les aspersions intra-domiciliaires de pyréthrinoïdes.
Figure 22. Abondances d'*An. gambiae* s.l. à Banizoumbou, estimées par les captures à l'atterrissage ainsi que les aspersions intradomiciliaires de pyréthrinoïdes.
Figure 23. Abondance d'*An. gambiae* s.l. capturé sur homme au cours des trois saisons pluvieuses.
Figure 24. Taux d'endophagie (A) et indice d'endophilie (B) d'*An. gambiae* s.l. estimés dans les six sites durant la saison des pluies.
Figure 25. Taux d'endophagie d'*An. gambiae* s.l. estimé à Banizoumbou et Zindarou.
Figure 26. Indice d'endophilie d'*An. gambiae* s.l. en saison des pluies à Zindarou.
Figure 27. Taux de parturité d'*An. gambiae* s.l. pendant les saisons des pluies 2005 à 2007.
Figure 28. Variations du taux de parturité d'*An. gambiae* s.l. à Zindarou entre 2003 et 2007.
Figure 29. Répartition des espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae* pendant les saisons des pluies 2005 à 2007.
Figure 30. Proportion relative d'*An. gambiae* M dans les échantillons d'*An. gambiae* s.l. selon la méthode de capture utilisée, au cours des trois saisons des pluies étudiées dans quatre villages.
Figure 31. Estimation des abondances d'*An. gambiae* M et *An. arabiensis* dans les huit sites suivis de 2005 à 2007.
Figure 32. Taux d'infection d'*An. gambiae* s.l. estimé à Banizoumbou et Zindarou pendant les saisons des pluies 2004 à 2007 (échantillons collectés en août et octobre confondus).
Figure 33. Variations du taux d'infection *d'An. gambiae* s.l. estimé à Zindarou de 2004 à 2007.
Figure 34. Taux d'inoculation entomologique journalier d'*An. gambiae* s.l. estimé dans six villages sahéliens durant les saisons des pluies 2005-2007.
Figure 35. Variations du taux d'inoculation entomologique journalier dû à *An. gambiae* s.l., estimé à Zindarou de 2004 à 2007.
Figure 36. Evolution du taux d'inoculation entomologique journalier d'*An. funestus* estimé à Zindarou d'août 2004 à août 2006.
Figure 37. Estimation du risque d'infection dû à *An. gambiae* s.l. en fonction de la période d'exposition (jours), durant la saison des pluies dans l'ensemble des six sites du transect suivis de 2005 à 2007.

Figure 38. Cumuls pluviométriques annuels (mm) (au 30 octobre) estimés en 2005 (haut) et 2006 (bas).
Figure 39. Différence de pluviométrie estimée en 2006 par rapport à 2005.
Figure 40. Fréquence allélique moyenne (tous villages confondus) de la mutation kdr-w chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae*, par année et méthode de capture.
Figure 41. Vue du Gountou Yena durant le début de saison des pluies (juin 2008), montrant le petit cours d'eau bordé de végétation et de zones de maraîchage à petite échelle (en haut à gauche), où de fortes fréquences de la mutation *kdr* ont été observées chez *An. gambiae* M.
Figure 42. Observation du nombre de LLIN suspendues dans les ménages des villages du suivi transversal, en début (juin), pic (septembre) et fin (décembre) de la saison des pluies 2007 (moyenne sur 30 maisons par village et passage).
Figure 43. Carte du Niger indiquant les sites de capture (cercles blancs) et les zones éco-climatiques.
Figure 44. Résultats de l'analyse bayesienne de clusters pour l'ensemble des échantillons et le nombre de clusters le plus probable (K = 2).

Liste des tableaux

Tableau 1. Taux d'infection estimés par ELISA-CSP dans les échantillons d'*An. gambiae* s.l. collectés en 2005 (avant distribution des LLINs), 2006 et 2007 (après distribution).

Tableau 2. Indice sporozoïtique et taux d'inoculation entomologique d'*An. gambiae* s.l. à Banizoumbou durant la saison de transmission.

Tableau 3. Indice sporozoïtique (CSP) et taux d'inoculation entomologique journalier (Nombre estimé de piqûres potentiellement infectantes par homme et par jour) (EIR journalier) d'*An.funestus* à Guidimouni de 2005 à 2007.

Tableau 4. Fréquence allélique de la mutation *kdr-w* dans les échantillons de la forme moléculaire M d'*An. gambiae*, par site et par année.

Tableau 5. Fréquence allélique de la mutation *kdr-w* chez la forme moléculaire M d'*An. gambiae*, par site, année et méthode de capture.

Tableau 6. Utilisation de moustiquaires simples et imprégnées dans les douze villages du suivi transversal de la transmission palustre en 2005 et 2006, tous sites et âges confondus, dans les ménages investigués.

Tableau 7. Utilisation de moustiquaires simples et imprégnées dans les douze villages du suivi transversal de la transmission palustre en 2007, chez les enfants de moins de cinq ans et les enfants de cinq à quinze ans, tous sites confondus.

Tableau 8. Caractéristiques des marqueurs microsatellites utilisés: localisation chromosomique, pourcentage d'échantillons correctement génotypés (% pos), échelle de taille des fragments amplifiés (size range), et nombre d'allèles distincts trouvés (Nall).

Tableau 9. Richesse allélique (*R*s), hétérozygotie observée (*H*o), hétérozygotie attendue d'après HW (*H*e), et indice *F*is des échantillons étudiés.

Tableau 10. Différenciation génotypique (F_{ST}) intra- et inter-espèces des échantillons collectés en 2005 et 2006.

Tableau 11. Différenciation génotypique et indices F_{ST} temporels, par comparaison des échantillons collectés en 2005 et 2006.

Tableau 12. Détails des effectifs analysés pour l'étude de génétique des populations, par méthode et lieu de capture (Capture à l'atterrissage sur sujet humain à l'intérieur/extérieur, capture de la faune au repos dans les habitations, pièges lumineux de type CDC).

Tableau 13. F_{IS} des sous-échantillons d'*An. gambiae* M et *An. arabiensis* par méthode de capture, tous loci (sans 2H46 et 3H158) et années confondues.

Tableau 14. Résultats du test de détection d'expansion ou de réduction populationnelle (CORNUET and LUIKART 1996), sous les différents modèles mutationnels.

Tableau 15. Estimation des effectifs efficaces (N_e) des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*, considérant les douze loci étudiés.

Liste des annexes

Annexe 1. Revue des études publiées sur la fréquence allélique des mutations *kdr-e* et *kdr-w* dans les populations d'*An. gambiae* s.s. en Afrique.

Annexe 2. Liste des 12 marqueurs microsatellites utilisés pour l'étude de la structure génétique des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*.

Annexe 3. Richesse allélique (*Rs*), index d'hétérozygotie observée (*Ho*) et attendue (*He*) et *Fis* des échantillons d'*An. arabiensis* collectés en 2005 et 2006, par locus (supplément 1 de l'article original). Les *Fis* indiqués en gras sont significatifs.

Annexe 4. Richesse allélique (*Rs*), index d'hétérozygotie observée (*Ho*) et attendue (*He*) et *Fis* des échantillons d'*An. gambiae* M collectés en 2005 et 2006, par locus (supplément 2 de l'article original). Les *Fis* indiqués en gras sont significatifs.

Annexe 5. Observations concernant *An. hervyi*, publiées dans *Medical and Veterinary Entomology* (Mars 2010; 24(1): 62-65).

Annexe 6. Fréquences alléliques des douze marqueurs microsatellites utilisés, tous sites et années confondues.

Annexes

Annexe 1. Revue des études publiées sur la fréquence allélique des mutations *kdr-e* et *kdr-w* dans les populations d'*An. gambiae* s.s. en Afrique. Méthodes de collecte : LC, landing catches (captures à l'atterrissage) ; IRC, indoor resting collections (collecte de la faune résiduelle à l'intérieur) ; CDC, pièges lumineux de type CDC ; larv, collectes larvaires ; PSC, pyrethrum spray catch (aspersions intra-domiciliaires d'insecticide). Zone écologique : C, savane côtière ; F, forêt equatoriale ; SG, savane guinéenne ; SSO, savane soudanienne ; SSA, savanne sahélienne ; M, mangrove. Présence (pres) : Y, yes ; N, no. freq w/e, fréquence allélique de *kdr-w/e*.

Article		Echantillonage							gambiae M					gambiae S					
Auteur	Année	Pays	site(s)	Année	Methode	Zone éco	rur/urb	utilisation sols	n	pres	freq w	pres	freq e	n	pres	freq w	pres	freq e	Remarque
Weill	2000	Bénin	cotonou	nc	nc	C	péri-urbain			Y	69,0%	-			N	0,0%	-		
Weill	2000	Cameroun	Mfou	nc	nc	F	rural			N	0,0%	-			-		-		
Weill	2000	RCA	bangui	nc	nc		urbain			-		-			Y		-		
Weill	2000	Sénégal	wassadou	nc	nc		rural			-		-			Y		-		
Weill	2000	Ouganda	fort portal	nc	nc		rural			-		-			-		-		
Weill	2000	BF	2 sites dt bobo	nc	nc		péri-urbain			N	0,0%	-			Y		-		
Weill	2000	Civoire	3 sites	nc	nc		rural			N	0,0%	-			Y		-		
Chandre	2000	Civoire	Bouaké	nc	larv		urbain			-		-			Y	95%	-		
Fanello	2000	Bénin	5 sites	nc	nc	nc	nc			Y	>30%	-			Y	>30%	-		
Berzosa	2002	Bioko	8 sites	nc	LC/IRC/CDC	C	rural	ITNs		N	0,0%	-			N	0,0%	-		effectifs faibles
Della Torre	2001	Bénin		1998	IRC	SG			58	Y	46,0%	-		35	Y	47%	-		
Della Torre	2001	Civoire		1998	IRC	SG			48	N	0,0%	-		92	Y	90%	-		
Della Torre	2001	Civoire		1998	IRC	F			47	N	0,0%	-		26	Y	6%	-		
Fanello	2003	Mali	Banambani	1987	IRC	SSO	rural	maraichage	5	N	0,0%	-		24	Y	2%	-		effectifs M faibles
Fanello	2003	Mali	Banambani	1996	IRC	SSO	rural	maraichage	4	N	0,0%	-		42	Y	29%	-		
Fanello	2003	Mali	Banambani	2000	IRC	SSO	rural	maraichage	8	N	0,0%	-		68	Y	55%	-		
Fanello	2003	Mali	Ngabakoro	1999	IRC	SSO	rural	riz	70	N	0,0%	-		31	Y	7%	-		
Fanello	2003	Mali	Pimperena	1996	IRC	SSO	rural	cotton	5	N	0,0%	-		51	Y	89%	-		
Fanello	2003	Mali	Pimperena	2000	IRC	SSO	rural	cotton	3	N	0,0%	-		53	Y	83%	-		
Awolola	2003	Nigéria	4 sites Sud-Ouest	2002	IRC	F				N	0,0%	-			Y	>83%	-		survivants bioessais
Awolola	2005	Nigéria	2 sites	2003	larv/IRC	M				N	0,0%	-			N	0,0%	-		survivants bioessais
Awolola	2005	Nigéria	2 sites	2003	larv/IRC	F				N	0,0%	-		26	Y	0-46%	-		survivants bioessais
Awolola	2005	Nigéria	3 sites	2003	larv/IRC	F				N	0,0%	-		16-38	Y	37,5-48,1%	-		survivants bioessais
Awolola	2005	Nigéria	3 sites	2003	larv/IRC	SG				N	0,0%	-		22-30	Y	45,5-53,3%	-		survivants bioessais
Awolola	2005	Nigéria	3 sites	2003	larv/IRC	SSO			17	N	0,0%	-			N	0%	-		survivants bioessais
Etang	2003	Cameroun	Douala	nc	larv	C	urbain			N	0,0%	-			-		-		survivants bioessais
Etang	2003	Cameroun	Sud	nc	larv	F				N	0,0%	-			N	0,0%	-		survivants bioessais
Etang	2003	Cameroun	Nord	nc	larv	SSO	rural			-		-			N	0,0%	-		survivants bioessais
Etang	2006	Cameroun	Douala	2003	larv	C	urbain		41	Y	3,5%	-			-		-		survivants bioessais
Etang	2006	Cameroun	Côte	2003	larv	C	nc			-		-		21	Y	14%	N		survivants bioessais
Etang	2006	Cameroun	Foumbot (montagne)	2003	larv	F	rural	maraichage		-		-			Y	39%	Y	4%	survivants bioessais
Diabate	2002	BF	VK5	1999	larv	SG	rural	riz	55	N	0,0%	-			-				
Diabate	2002	BF	VK7	1999	larv	SG	rural	riz	15	N	0,0%	-			Y	89%	-		
Diabate	2002	BF	Léna	1999	larv	SG	rural	cotton		-		-			Y	90%	-		
Diabate	2002	BF	Bobo	1999	larv	SG	urbain			-		-			Y	96%	-		
Diabate	2002	BF	Batié	1999	larv	SG	nc			-		-			Y	18%	-		
Diabate	2003	BF	VK7	1999	larv/LC	SG	rural	riz	44	Y	0,6%	-			Y	95%	-		
Diabate	2003	BF	VK7	2000	larv/LC	SG	rural	riz	80	Y	2,0%	-			Y	96%	-		
Diabate	2004	BF	12 sites	nc	larv	SG				N	0,0%	-			Y	33-94%	-		
Diabate	2004	BF	VK7	nc	larv	SG	rural	riz	173	Y	2,0%	-			Y	94%	-		
Diabate	2004	BF	9 sites	nc	larv	SSO				N	0,0%	-			Y	17-83%	-		
Diabate	2004	BF	2 sites	nc	larv	SSA				N	0,0%	-			Y	0-38%	-		
Yawson	2004	Ghana	Okyereko	2003	IRC/PSC/larv	M	rural	riz-irrig	74	Y	3,4%	-			Y	95%	-		
Yawson	2004	Ghana	Manpong	2003	IRC/PSC/larv	M	rural	riz-irrig	33	Y	1,6%	-			Y	95%	-		
Yawson	2004	Ghana	Abia	2003	IRC/PSC/larv	M	rural		42	Y	1,2%	-			Y	97%	-		
Yawson	2004	Ghana	5 sites	2003	IRC/PSC/larv	C	rural	maraichage	17	N	0,0%	-			Y	>82%	-		
Yawson	2004	Ghana	Kumasi	2003	IRC/PSC/larv	F	urbain			-		-			Y	100%	-		
Yawson	2004	Ghana	Korania	2003	IRC/PSC/larv	SG	rural	irrig	95	N	0,0%	-			-		-		
Yawson	2004	Ghana	Bonia	2003	IRC/PSC/larv	SG	rural	irrig	86	Y	0,6%	-			-		-		
Yawson	2005	BF	Koubri	2003	IRC/PSC/larv	SSO	rural		78	Y	0,7%	-		2	Y	25%	-		

(suite)

Article		Echantillonage							gambiae M				gambiae S				
Auteur	Année	Pays	site(s)	Année	Methode	Zone éco	rur/urb	utilisation sols	n	pres	freq w	pres freq e	n	pres	freq w	pres freq e	Remarque
Kristan	2003	Nigéria	3 sites Sud-Ouest	2001	larv	F			7	N	0,0%	-	7	N	0%	-	effectifs faibles
Corbel	2004	Bénin	Cotonou	nc	ExpHuts	C	urbain		281	Y	68,5%	-				-	
Reimer	2005	Bioko	Malabo	2002	IRC/LC	C	urbain		19	Y	56,0%	-		-		-	
Reimer	2005	Cameroun	Tiko	2002	IRC	C	rural		68	N	0,0%	-		-		-	
Tripet	2006	Bioko	Malabo	nc	nc		urbain		70	Y	50,0%	-		-		-	
Pinto	2006	Gabon	Libreville	2000	LC	C	urbain			-		-		Y	37%	Y 63%	
Girod	2006	Civoire	Abidjan	2004	LC/CDC	C	péri-urbain	LAV++	104	Y	70,0%	-		-		-	
Verhaeghen	2006	Ouganda	7 sites	2001	LC	nc	nc	nc		-		-		Y	0,7%	Y 33,3%	
Akogbeto	2006	Bénin	Cotonou	nc	larv	C	péri-urbain	maraichage		Y	90,0%	-		-		-	
Akogbeto	2006	Bénin	Parakou	nc	larv	SG	péri-urbain	maraichage		Y	10,0%	-		-		-	Parakou M ou S kdr ?
Cuamba	2006	Angola	7 sites	2001			péri-urbain		377	N	0,0%	-	26	N	0%	-	
Tripet	2007	Mali	Banambani	1993	IRC/larv	SSO	rural	maraichage	46	N	0,0%	-	20	Y	2,5%	-	
Tripet	2007	Mali	Banambani	2003	IRC/larv	SSO	rural	maraichage	96	N	0,0%	-	63	Y	28%	-	
Tripet	2007	Mali	Banambani	2004	IRC/larv	SSO	rural	maraichage	3	N	0,0%	-	25	Y	26,0%	-	
Tripet	2007	Mali	Selenkenyi	1993	IRC	SSO	rural		80	N	0,0%	-	42	N	0,0%	-	
Tripet	2007	Mali	Selenkenyi	2002	IRC	SSO	rural		78	N	0,0%	-	27	Y	5,7%	-	
Tripet	2007	Mali	Selenkenyi	2004	IRC	SSO	rural		65	N	0,0%	-	38	Y	10,5%	-	
Tripet	2007	Mali	Soulouba	1996	IRC	SSO	rural	maraichage	5	N	0,0%	-	83	Y	37,3%	-	
Tripet	2007	Mali	Soulouba	2002	IRC	SSO	rural	maraichage	13	N	0,0%	-	71	Y	29,6%	-	
Tripet	2007	Mali	Soulouba	2003	IRC	SSO	rural	maraichage	2	N	0,0%	-	47	Y	46,8%	-	
Tripet	2007	Mali	Pimperena	1996	IRC	SSO	rural	cotton	8	N	0,0%	-	62	Y	89,5%	-	
Tripet	2007	Mali	Pimperena	2002	IRC	SSO	rural	cotton	10	N	0,0%	-	60	Y	82,5%	-	
Corbel	2007	Bénin	Malanville	2005	larv	SSO	rural	riz	42	Y	6,0%	-		-		-	
Corbel	2007	Bénin	Parakou	2005	larv	SG	urbain	maraichage		-		-	34	Y	20%	-	
Corbel	2007	Bénin	Cotonou-Ladji	2005	larv	C	péri-urbain	champs	92	Y	80,0%	-		-		-	
Corbel	2007	Bénin	Cotonou-Asecna	2005	larv	C	péri-urbain	maraichage			80,0%	-		-		-	
Djouaka	2007	Nigéria	6 sites SW	nc	larv	SG	nc		180	N	0,0%	-		-		-	résistance, gîtes pollués
Pinto	2007	Senegal	Kedougou	2002	nc	SSO				-		-	17	Y	11,8%	N 0,0%	
Pinto	2007	Mali	N'Gabacoro	2000	nc	SSO				-		-	8	Y	25,0%	N 0,0%	
Pinto	2007	Mali	Banambani	2000	nc	SSO				-		-	7	Y	71,4%	N 0,0%	
Pinto	2007	Mali	Pimperena	2000	nc	SSO				-		-	4	Y	62,5%	N 0,0%	
Pinto	2007	Civoire	Danta	1998	nc	F				-		-	2	N	0,0%	N 0,0%	
Pinto	2007	Civoire	M'bé	1998	nc	F				-		-	3	Y	66,7%	N 0,0%	
Pinto	2007	Civoire	Yakoffikro	1998	nc	F				-		-	3	Y	100,0%	N 0,0%	
Pinto	2007	Civoire	Ziglo	1998	nc	F				-		-	5	Y	10,0%	N 0,0%	
Pinto	2007	BF	Dioulassouba	2001	nc	SSO				-		-	3	Y	100,0%	N 0,0%	
Pinto	2007	BF	Goundry	1998	nc	SSA				-		-	3	Y	16,7%	N 0,0%	
Pinto	2007	Ghana	Accra	2002	nc	C				-		-	26	Y	69,2%	N 0,0%	
Pinto	2007	Bénin	Bohicon	1998	nc	C				-		-	5	Y	50,0%	N 0,0%	
Pinto	2007	Nigéria	Kobape	2001	nc	C				-		-	7	Y	7,1%	N 0,0%	
Pinto	2007	Nigéria	Olugbo	2001	nc	C				-		-	8	Y	18,8%	N 0,0%	
Pinto	2007	Cameroun	Magba	nc	larv	F				-		-	15	Y	36,7%	Y 13,3%	
Pinto	2007	Guinée Ecuat	Miyobo	2003	nc	C				-		-	7	Y	21,4%	Y 21,4%	
Pinto	2007	Guinée Ecuat	Ngonamanga	2004	nc	C				-		-	8	Y	37,5%	Y 43,8%	
Pinto	2007	Bioko	Sacriba	2003	nc	C				-		-	7	Y	7,1%	N 0,0%	

(suite)

Article		Echantillonage							gambiae M					gambiae S					
Auteur	Année	Pays	site(s)	Année	Methode	Zone éco	rur/urb	utilisation sols	n	pres	freq w	pres	freq e	n	pres	freq w	pres	freq e	Remarque
Pinto	2007	Gabon	Bakoumba	2000	nc	F				-		-		22	Y	29,5%	Y	25,0%	
Pinto	2007	Gabon	Benguia	1999	nc	F				-		-		17	Y	5,9%	Y	17,6%	
Pinto	2007	Gabon	Denga	1999	nc	F				-		-		14	Y	7,1%	Y	10,7%	
Pinto	2007	Gabon	Libreville	2000	nc	F				-		-		19	Y	47,4%	Y	52,6%	
Pinto	2007	Angola	Cabinda	2000	nc	C				-		-		18	Y	22,2%	Y	41,7%	
Pinto	2007	Kenya	Asembo	2003	nc					-		-		13	N	0,0%	Y	61,5%	
Pinto	2007	Tanzanie	Ifakara	1999	nc					-		-		15	N	0,0%	N	0,0%	
Pinto	2007	Malawi	Chipula	2003	nc					-		-		4	N	0,0%	N	0,0%	
Pinto	2007	Malawi	Thyolo	1997	nc					-		-		9	N	0,0%	N	0,0%	
Pinto	2007	Mozambique	Furvela	2005	nc					-		-		19	N	0,0%	N	0,0%	
Awolola	2007	Nigéria	Ibadan	2002	IRC	F	péri-urbain	Maïs&Cacao		N	0,0%	-			Y	nc	-		
Awolola	2007	Nigéria	Ibadan	2003	IRC	F	péri-urbain	Maïs&Cacao		Y	nc	-			Y	nc	-		
Awolola	2007	Nigéria	Ibadan	2004	IRC	F	péri-urbain	Maïs&Cacao		N	0,0%	N	0%		Y	nc	N	0%	
Awolola	2007	Nigéria	Ibadan	2005	IRC	F	péri-urbain	Maïs&Cacao		N	0,0%	N	0%		Y	nc	N	0%	
Reimer	2008	Cameroun	2 villages	2006	larv	F			87	Y	6,0%	Y	1%	656	Y	53,0%	Y	14%	
Chen	2008	Kenya	Ouest – 7 sites	2005	larv					-		-			N		N		
Chen	2008	Kenya	Ouest – 3 sites (kdr+)	2005	larv					-		-		183	N		Y	10,7%	
Chen	2008	Kenya	Côte Est – 2 sites	2005	larv					-		-			N		N		
Chouaibou	2008	Cameroun	Nord – 3 sites	2005	larv	SSO	rur/urb	cotton		-		-		45	Y	1,1%	Y	1,1%	survivants bioessais
Janeira	2008	Angola		2006	nc					Y	nc	N	0%		-		-		
Janeira	2008	Bioko		2003	nc					N	0,0%	N	0%		Y	nc	Y	nc	
Janeira	2008	Gabon		1999	nc					-		-			Y	nc	Y	nc	
Janeira	2008	Sao Tomé		2003	nc					N	0,0%	N	0%		-		-		
Moreno	2008	Guinée Equat	Miyobo	2004	IRC	F	rural			-		-		95	Y	9,0%	Y	16,0%	
Moreno	2008	Guinée Equat	Ngonamanga	2004	IRC	C	rural		174	Y	3,0%	N		20	Y	28%	Y	40%	
Santolamazza	2008	Sénégal	Kedougou	2001	IRC	SSO	rural			-		-		39	Y	14,1%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Sénégal	Kedougou	2005	IRC	SSO	rural			-		-		43	Y	18,6%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Sénégal	Tambacounda	2006	IRC	SSO	rural		22	N	0,0%	N	0%		-		-		
Santolamazza	2008	Gambie	Ile McCarthy	2003	IRC	SG	rural		17	N	0,0%	N	0%		-		-		
Santolamazza	2008	BF	Bobo	2001	larv	SSO	urbain		31	N	0,0%	N	0%	24	Y	97,9%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Ghana	Accra	2002	larv	F				-		-		25	Y	78,0%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Civoire	Bouaké	1998	IRC	SG				-		-		23	Y	100,0%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Bénin	Dassa	2002	IRC	SG			5	Y	40,0%	N	0%	48	Y	59,4%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Nigéria	Kopabe, Olugbo	2001	larv	SG	rural		41	Y	19,5%	N	0%	49	Y	16,3%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Cameroun	Mangoum	2006	larv	F	rural	agriculture +++		-		-		75	Y	84,0%	Y	15,3%	
Santolamazza	2008	Cameroun	Kribi	2005	larv	C	urbain		48	Y	6,3%	N	0%	6	Y	66,7%	Y	8,3%	
Santolamazza	2008	Cameroun	Dabadi	2006	larv	C	urbain			-		-		64	Y	47,7%	Y	14,1%	
Santolamazza	2008	Gabon	Benguia	1999	larv	F	rural			-		-		57	Y	6,1%	Y	7,0%	
Santolamazza	2008	Angola	Cabinda	2003	IRC	F				-		-		114	Y	18,0%	Y	30,7%	
Santolamazza	2008	Angola	Kikudo	2002	IRC	F				-		-		46	N	0,00%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Angola	Saurimo	2002	IRC	F				-		-		15	N	0%	N	0,0%	
Santolamazza	2008	Angola	Luanda	2002	IRC	F			42	N	0,0%	N	0%		-		-		
Santolamazza	2008	Angola	Namibe	2002	IRC	D			15	N	0,0%	N	0%		-		-		
Santolamazza	2008	Sao Tomé	Riboque	2004	larv	F	urbain		100	N	0,0%	N	0%		-		-		
Santolamazza	2008	Sao Tomé	Rua Trabalhadores	1998	larv	F	urbain		33	N	0,0%	N	0%		-		-		

Annexe 2. Liste des 12 marqueurs microsatellites (Zheng *et al.*, 1996) utilisés pour l'étude de la structure génétique des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis*. Le tableau indique le motif nucléotidique répété, les fluorochromes couplés aux amorces "forward" pour les deux séries d'analyses (marq. IMTSSA et marq. PF8), les concentrations initiales (Ci) et de travail (Ctravail) des solutions mères d'amorces, la température de fusion des différentes amorces (Tm) et la température d'hybridation (Thybrid) employée lors des réactions de PCR.

marqueur	motif	amorces	marq. IMTSSA	marq. PF8	Ci (µM)	Ctravail (µM)	Dilution	Tm (°C)	T(hybrid)
AgXH53	GT	AGXH53F	6FAM	6FAM	393	10	39,3	62	55
		AGXH53R			409	10	40,9	62	
AgXH99	GT	AGXH99F	VIC	HEX	335	10	33,5	60	58
		AGXH99R			430	10	43	62	
AgXH678	AG	AGXH678F	NED	NED	313	10	31,3	64	58
		AGXH678R			275	10	27,5	60	
Ag2H46	GT	AG2H46F	PET	6FAM	425	10	42,5	62	58
		AG2H46R			231	10	23,1	62	
Ag2H197	GT	AG2H197F	-	HEX	321	10	32,1	60	58
		AG2H197R			237	10	23,7	64	
Ag2H26	GT	AG2H26F	-	NED	337	10	33,7	62	58
		AG2H26R			307	10	30,7	62	
Ag2H523	GT	AG2H523F	-	6FAM	290	10	29	62	58
		AG2H523R			284	10	28,4	62	
Ag2H117	GT	AG2H117F	-	HEX	301	10	30,1	62	58
		AG2H117R			337	10	33,7	60	
Ag3H93	GT	AG3H93F	VIC	NED	366	10	36,6	64	58
		AG3H93R			214	10	21,4	60	
Ag3H555	GT	AG3H555F	NED	6FAM	207	10	20,7	60	52
		AG3H555R			259	10	25,9	60	
Ag3H158	GT	AG3H158CD-F	-	HEX	255	10	25,5	58	58
		AG3H158CD-R			286	10	28,6	60	
Ag3H577	GT	AG3H577F	-	NED	304	10	30,4	60	58
		AG3H577R			301	10	30,1	62	

Annexe 3. Richesse allélique (*Rs*), index d'hétérozygotie observée (*Ho*) et attendue (*He*) et *Fis* des échantillons d'*An. arabiensis* collectés en 2005 et 2006, par locus (supplément 1 de l'article original). Les *Fis* indiqués en gras sont significatifs.

		2005 - Before LLINs					2006 - After LLINs							
		Bani	Zind	Maich	Fara	Dama	Bani	Zind	Maich	Fara	Dama	All 2005	All 2006	All
locus	2n	54	86	126	62	66	104	92	30	108	88	394	422	816
Chromosome X														
XH53	*Rs*	8,38	8,02	6,37	6,63	5,25	5,12	6,07	-	5,91	6,41	6,93	5,88	6,46
	Ho	0,539	0,585	0,550	0,516	0,656	0,471	0,465	0,667	0,673	0,568	0,566	0,556	0,561
	He	0,759	0,753	0,570	0,659	0,642	0,563	0,538	0,784	0,623	0,635	0,669	0,621	0,644
	Fis	0,294	**0,225**	0,035	0,220	-0,023	0,166	**0,137**	0,154	-0,081	0,106	**0,154**	**0,105**	**0,130**
XH678	*Rs*	6,39	4,33	5,32	3,99	3,52	6,35	4,69	-	4,29	4,39	4,71	4,93	4,81
	Ho	0,400	0,488	0,468	0,414	0,355	0,520	0,457	0,267	0,449	0,452	0,436	0,455	0,446
	He	0,634	0,575	0,621	0,617	0,544	0,639	0,559	0,549	0,559	0,593	0,605	0,587	0,596
	Fis	0,374	0,153	0,248	0,333	0,352	0,188	0,185	0,523	0,198	0,239	**0,280**	**0,225**	**0,251**
Chromosome 2														
2H46	*Rs*	6,97	8,42	9,46	9,47	7,85	9,07	9,81	-	9,27	9,27	8,44	9,36	8,84
	Ho	0,542	0,700	0,614	0,548	0,870	0,735	0,767	0,846	0,519	0,714	0,566	0,685	0,668
	He	0,797	0,868	0,855	0,882	0,819	0,852	0,860	0,865	0,845	0,846	0,669	0,851	0,853
	Fis	**0,325**	0,195	**0,284**	**0,382**	-0,063	0,139	0,108	0,022	**0,388**	0,158	**0,240**	**0,196**	**0,218**
2H197	*Rs*	5,40	4,64	4,95	6,78	4,57	4,86	5,29	-	3,26	4,25	5,27	4,42	4,89
	Ho	0,480	0,457	0,567	0,533	0,414	0,462	0,415	0,750	0,471	0,425	0,503	0,465	0,483
	He	0,527	0,454	0,493	0,582	0,450	0,510	0,571	0,721	0,505	0,480	0,495	0,531	0,514
	Fis	0,091	-0,007	-0,151	0,085	0,081	0,096	**0,276**	-0,042	0,069	0,117	-0,015	0,126	**0,060**
2H26	*Rs*	11,50	12,64	11,30	9,54	13,84	11,58	11,37	-	11,60	10,37	11,77	11,23	11,53
	Ho	0,815	0,775	0,821	0,750	0,871	0,800	0,818	0,615	0,804	0,705	0,808	0,772	0,789
	He	0,844	0,858	0,865	0,866	0,910	0,850	0,874	0,849	0,869	0,863	0,872	0,863	0,867
	Fis	0,035	0,098	0,051	0,136	0,044	0,059	0,064	0,284	0,076	0,185	0,074	0,105	0,090
2H523	*Rs*	6,71	6,61	6,87	6,23	6,52	5,99	6,91	-	6,49	6,88	6,59	6,57	6,58
	Ho	0,630	0,650	0,746	0,688	0,774	0,740	0,711	0,714	0,808	0,632	0,703	0,729	0,716
	He	0,730	0,686	0,763	0,777	0,767	0,737	0,750	0,749	0,748	0,636	0,745	0,726	0,736
	Fis	0,140	0,053	0,022	0,117	-0,010	-0,004	0,052	0,048	-0,081	0,007	0,056	-0,003	0,027
2H117	*Rs*	5,40	3,56	4,31	3,49	2,96	3,77	4,95	-	2,76	2,71	3,94	3,55	3,77
	Ho	0,482	0,186	0,355	0,438	0,194	0,250	0,261	0,400	0,389	0,341	0,325	0,318	0,321
	He	0,414	0,254	0,398	0,401	0,236	0,260	0,345	0,398	0,401	0,323	0,347	0,340	0,343
	Fis	-0,168	0,270	0,110	-0,092	0,184	0,040	0,245	-0,006	0,030	-0,056	0,065	0,066	0,065
Chromosome 3														
3H93	*Rs*	9,80	9,32	10,14	11,73	9,66	10,41	10,07	-	9,80	8,10	10,13	9,59	9,89
	Ho	0,482	0,575	0,636	0,724	0,571	0,635	0,674	0,600	0,615	0,628	0,603	0,635	0,620
	He	0,676	0,637	0,712	0,844	0,721	0,715	0,723	0,630	0,676	0,625	0,715	0,683	0,697
	Fis	0,291	0,098	0,107	**0,144**	0,211	0,114	0,069	0,049	0,091	-0,005	**0,156**	0,071	**0,111**
3H555	*Rs*	8,88	6,94	7,07	7,96	4,56	7,75	9,01	-	6,48	6,01	7,08	7,31	7,18
	Ho	0,630	0,452	0,508	0,433	0,273	0,654	0,717	0,533	0,463	0,455	0,461	0,569	0,517
	He	0,700	0,539	0,551	0,527	0,372	0,642	0,706	0,453	0,455	0,502	0,538	0,573	0,556
	Fis	0,102	0,162	0,078	0,180	0,269	-0,018	-0,017	-0,185	-0,018	0,095	**0,143**	0,007	0,069
3H158CD	*Rs*	5,86	4,42	5,35	5,98	5,06	4,89	4,34	-	3,00	3,46	5,33	3,92	4,71
	Ho	0,370	0,220	0,403	0,310	0,303	0,392	0,286	0,267	0,292	0,227	0,328	0,300	0,314
	He	0,575	0,674	0,585	0,506	0,525	0,628	0,644	0,561	0,534	0,569	0,588	0,591	0,590
	Fis	**0,360**	**0,677**	**0,312**	0,391	**0,426**	**0,378**	**0,559**	0,533	**0,456**	**0,603**	**0,442**	**0,493**	**0,468**
3H577	*Rs*	10,69	9,90	9,48	11,08	6,06	10,89	10,55	-	10,10	9,10	9,44	10,16	9,76
	Ho	0,692	0,714	0,667	0,655	0,606	0,769	0,750	0,714	0,854	0,707	0,667	0,769	0,719
	He	0,727	0,741	0,729	0,816	0,631	0,769	0,839	0,767	0,788	0,714	0,728	0,778	0,754
	Fis	0,049	0,036	0,086	**0,199**	0,040	-0,001	0,107	0,071	-0,085	0,009	0,084	0,012	0,047

Annexe 4. Richesse allélique (*Rs*), index d'hétérozygotie observée (*Ho*) et attendue (*He*) et *Fis* des échantillons d'*An. gambiae* M collectés en 2005 et 2006, par locus (supplément 2 de l'article original). Les *Fis* indiqués en gras sont significatifs.

		2005 - Before LLINs					2006 - After LLINs							
		Garey	Bani	Zind	Maich	Fara	Garey	Bani	Zind	Maich	Fara	All 2005	All 2006	All
locus	2n	92	104	78	224	98	68	86	94	52	108	596	408	1004
Chromosome X														
XH53	*Rs*	6,15	7,95	7,25	7,05	7,00	6,84	8,24	7,03	7,71	6,75	7,08	7,31	7,20
	Ho	0,705	0,740	0,744	0,783	0,776	0,719	0,732	0,721	0,696	0,811	0,757	0,745	0,752
	He	0,746	0,817	0,825	0,787	0,755	0,786	0,809	0,808	0,794	0,783	0,787	0,798	0,791
	Fis	0,056	0,096	0,100	0,005	-0,028	0,087	**0,097**	0,109	0,127	-0,037	0,038	**0,067**	0,049
XH99	*Rs*	5,33	4,41	5,04	4,93	5,21	4,58	5,17	4,83	4,87	5,20	4,98	4,93	4,96
	Ho	0,689	0,571	0,568	0,574	0,531	0,618	0,405	0,721	0,609	0,700	0,583	0,615	0,596
	He	0,741	0,731	0,709	0,741	0,730	0,717	0,728	0,730	0,728	0,744	0,733	0,727	0,731
	Fis	0,071	**0,220**	0,201	**0,227**	**0,275**	0,140	**0,447**	0,012	0,166	0,060	**0,205**	0,155	**0,185**
XH678	*Rs*	5,85	5,83	5,36	4,27	6,21	4,84	6,05	5,58	5,56	4,70	5,50	5,35	5,43
	Ho	0,489	0,539	0,447	0,395	0,521	0,412	0,450	0,522	0,480	0,377	0,462	0,444	0,455
	He	0,461	0,538	0,463	0,413	0,519	0,406	0,480	0,470	0,468	0,349	0,467	0,428	0,452
	Fis	-0,061	-0,001	0,033	0,045	-0,004	-0,014	0,063	-0,112	-0,027	-0,082	0,009	-0,038	-0,007
Chromosome 2														
2H46	*Rs*	8,95	9,92	9,81	9,77	10,14	9,72	8,40	9,32	10,00	8,77	9,72	9,24	9,48
	Ho	0,558	0,512	0,568	0,604	0,625	0,696	0,537	0,691	0,800	0,491	0,581	0,609	0,592
	He	0,844	0,878	0,866	0,864	0,873	0,858	0,872	0,865	0,868	0,839	0,866	0,863	0,865
	Fis	**0,341**	**0,420**	**0,347**	**0,301**	**0,286**	0,193	**0,388**	0,204	0,080	**0,417**	**0,329**	**0,295**	**0,316**
2H197	*Rs*	10,01	10,40	10,88	10,78	12,01	10,17	10,17	11,64	13,71	10,44	10,81	11,22	11,02
	Ho	0,750	0,787	0,875	0,879	0,864	0,897	0,769	0,814	0,857	0,755	0,840	0,807	0,826
	He	0,850	0,856	0,885	0,872	0,890	0,879	0,847	0,877	0,899	0,871	0,868	0,871	0,869
	Fis	0,119	0,081	0,012	-0,009	0,030	-0,020	0,093	0,073	0,048	0,134	0,032	0,074	0,049
2H26	*Rs*	7,23	6,49	7,78	7,48	6,10	9,08	6,14	8,38	7,90	7,48	7,02	7,79	7,40
	Ho	0,689	0,551	0,769	0,677	0,553	0,467	0,714	0,659	0,476	0,577	0,649	0,598	0,629
	He	0,710	0,665	0,748	0,733	0,647	0,724	0,685	0,712	0,778	0,717	0,706	0,718	0,711
	Fis	0,030	0,173	-0,029	0,077	0,146	**0,359**	-0,043	0,075	0,394	0,197	0,081	**0,168**	**0,116**
2H523	*Rs*	11,96	10,33	10,56	11,08	12,08	9,66	10,26	14,90	12,47	12,04	11,20	11,87	11,53
	Ho	0,707	0,694	0,605	0,651	0,694	0,531	0,721	0,568	0,625	0,630	0,668	0,619	0,648
	He	0,681	0,741	0,714	0,642	0,744	0,697	0,730	0,778	0,765	0,711	0,693	0,734	0,710
	Fis	-0,038	0,065	0,154	-0,015	0,068	0,241	0,013	**0,272**	0,186	0,115	0,036	**0,157**	**0,088**
2H117	*Rs*	7,91	7,36	7,00	6,95	7,66	7,60	7,39	7,22	5,99	7,05	7,38	7,05	7,21
	Ho	0,756	0,700	0,763	0,732	0,711	0,788	0,732	0,696	0,731	0,833	0,731	0,758	0,742
	He	0,786	0,749	0,756	0,751	0,807	0,721	0,713	0,717	0,751	0,723	0,764	0,718	0,747
	Fis	0,039	0,066	-0,010	0,026	0,119	-0,094	-0,026	0,030	0,028	-0,154	0,044	-0,055	0,007
Chromosome 3														
3H93	*Rs*	6,59	9,78	8,21	9,15	9,49	7,98	9,80	10,31	10,12	9,71	8,64	9,59	9,12
	Ho	0,594	0,673	0,684	0,746	0,809	0,765	0,691	0,705	0,720	0,736	0,717	0,722	0,719
	He	0,770	0,834	0,749	0,824	0,817	0,842	0,844	0,843	0,838	0,820	0,812	0,836	0,822
	Fis	0,232	0,194	0,088	0,095	0,011	0,094	0,184	0,166	0,144	0,104	0,117	**0,136**	**0,125**
3H555	*Rs*	7,83	10,01	11,50	11,06	10,50	8,19	11,96	9,19	7,88	12,24	10,18	9,89	10,04
	Ho	0,611	0,846	0,722	0,807	0,787	0,594	0,902	0,723	0,654	0,833	0,775	0,760	0,769
	He	0,818	0,829	0,839	0,861	0,841	0,828	0,881	0,837	0,774	0,858	0,849	0,850	0,849
	Fis	0,256	-0,021	0,141	0,062	0,064	0,286	-0,025	0,137	0,158	0,029	0,087	0,106	0,095
3H158CD	*Rs*	9,50	7,02	9,22	8,17	8,07	7,27	8,49	9,03	8,75	8,48	8,39	8,40	8,40
	Ho	0,595	0,500	0,692	0,574	0,521	0,774	0,581	0,617	0,680	0,540	0,571	0,622	0,592
	He	0,837	0,721	0,810	0,768	0,782	0,775	0,806	0,830	0,802	0,743	0,780	0,803	0,789
	Fis	**0,291**	**0,309**	0,147	**0,253**	**0,336**	0,001	**0,281**	0,258	0,155	**0,275**	**0,268**	**0,225**	**0,250**
3H577	*Rs*	8,66	7,55	8,39	8,06	10,05	9,42	10,87	11,19	7,55	7,72	8,54	9,35	8,95
	Ho	0,581	0,480	0,541	0,571	0,591	0,485	0,698	0,643	0,600	0,566	0,556	0,602	0,575
	He	0,632	0,576	0,568	0,624	0,637	0,704	0,745	0,710	0,580	0,648	0,609	0,684	0,641
	Fis	0,081	0,168	0,050	0,085	0,074	0,315	0,064	0,096	-0,036	0,127	**0,088**	0,120	**0,103**

Annexe 5. Observations concernant *An. hervyi*, publiées dans *Medical and Veterinary Entomology* (Mars 2010; 24(1): 62-65).

Medical and Veterinary Entomology

Medical and Veterinary Entomology (2009), doi: 10.1111/j.1365-2915.2009.00824.x

Anopheles hervyi in Niger: no evidence for a role in *Plasmodium falciparum* transmission

R. LABBO[1], C. CZEHER[1], A. DJIBRILA[1], I. ARZIKA[1], I. JEANNE[2] and J. B. DUCHEMIN[1]

[1]Laboratoire d'Entomologie Médicale de l'Unité "Parasitologie" du CERMES (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire), Institut Pasteur International Network, Niamey, Niger and [2]Unité "Santé, Environnement et Climat" du CERMES (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire), Institut Pasteur International Network, Niamey, Niger

Abstract. *Anopheles hervyi* is an endemic mosquito species with a very limited spatial distribution in the south east of Niger. No new captures have been reported since the 1960s and its role in malaria transmission has not been studied. In the present study, the use of CDC light traps showed it to be much more abundant than previously found but there was no evidence to suggest it was a malaria vector in this region. The larval habitats have not been identified but the potential role of a saline lake in determining the distribution of this species is discussed.

Key words. *Anopheles hervyi*, malaria, Niger.

Introduction

The diversity of ecosystems and the changes brought about by human activities, both contribute to the diversity of malaria vector systems in Africa. Besides the main African malaria vectors (*Anopheles gambiae, An. arabiensis* and *An. funestus*), many secondary or accessory vectors can modulate the local transmission. Previously reported in Niger as *An. salbaii* (Hamon *et al.*, 1963), *An. hervyi* was described in 1999 as a new endemic species (Brunhes *et al.*, 1999). However, there was insufficient data to evaluate its role in malaria transmission in Niger. The *An. hervyi* specimens were scarce but always collected on humans or in houses (Hamon *et al.*, 1963; Brunhes *et al.*, 1966). Neither the ecology nor the behaviour of this mosquito species have been described from these rare captures. Recent fieldwork in the area of distribution of *An. hervyi* in the south east of Niger allowed its potential role as a malaria vector to be investigated.

Materials and methods

Cross-sectional entomological surveys were carried out from 2005 to 2007 in Guidimouni village (13°41′N, 9°30′E), 92.5 km East of Zinder (Fig. 1). The village is located near a natural saline-alkaline water lake. In October 2008, the lake had a conductivity of 1016 ms, a temperature of 29.8°C, pH of 9.30 and 506 mg/L of dissolved oxygen. The village is surrounded by farms, orchards and tree-planted zones, which allow agricultural production beyond the limits of the rainy season. Captures were conducted successively in the rainy season (June to September), the dry-cold season (November to February) and the dry-hot season (March to May). Three sampling methods were used to collect adult mosquitoes according to the same schema at each village and each period: (i) five houses sampled by indoor pyrethrum spray catches during early morning, (ii) two consecutive nights (19.00 to 07.00 hours) of indoor and outdoor human landing catches in three houses and (iii) two consecutive nights using four light-traps (two indoors and two outdoors). Species were identified in the field using morphological characteristics according to a local identification key built according to Hervy *et al.* (1998) and Brunhes *et al.* (1999) and following the morphological parameters for *An. hervyi*: number of white rings on maxillary palps, colour of the fourth segment of maxillary palps and ornamentation of the three pairs of legs. *Anopheles* specimens were individually stored with desiccant and kept at −20°C until processed in the laboratory. The classifications were then confirmed using an electronic key (Hervy *et al.*, 1998) and the original species description (Brunhes *et al.*, 1999). The head and anterior third of the thorax were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) (Wirtz *et al.*, 1987).

Correspondence: Rabiou Labbo, CERMES (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire), Institut Pasteur International Network, 634 Bd de la Nation, YN034-BP 10887 Niamey, Niger. Tel: +227 20 75 20 40, +227 20 75 20 45; fax: +227 20 75 31 80; e-mail: rabiou@cermes.org

© 2009 Centre de Recherche Médicale et Sanitaire
Journal compilation © 2009 The Royal Entomological Society

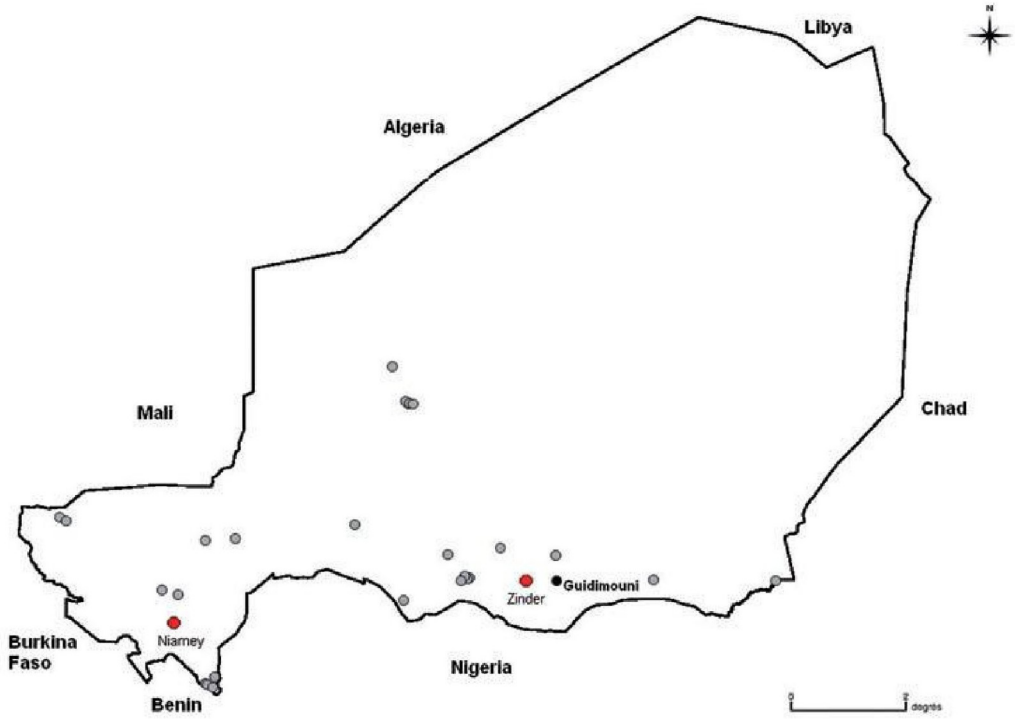


Fig. 1. Map of Niger: the grey disks indicate entomological sampling sites where no Anopheles hervyi were collected, Guidimouni as the black disk where this mosquito was found in abundance, and the red disks indicate important cities of study area.

Table 1. Main species of Anopheles sampled in Guidimouni according to the season.

	Anopheline						
Seasons	*An. hervyi*	%	*An. funestus*	%	*An. gambiae sl.*	%	Total
Rainfall 2005	1332	75.0	404	22.8	39	2.2	177
Dry cold 2006	0	0.0	242	65.8	126	34.2	368
Dry warm 2006	0	0.0	47	92.2	4	7.8	51
Rainfall 2006	29	6.7	343	79.6	59	13.7	431
Dry cold 2007	79	38.3	109	52.9	18	8.7	206
Rainfall 2007	7482	83.7	1312	14.7	144	1.6	8938
Dry cold 2008	3	2.7	106	93.8	4	3.5	113
Total	8925	75.1	2563	21.6	394	3.3	11882

Results and discussion

After 40 years (Hamon *et al.*, 1963; Brunhes *et al.*, 1966), *An. hervyi* was found again in Guidimouni. During the present study, 13 446 mosquitoes (89% *Anopheles* sp.) were collected in the village during seven sampling periods between 2005 and 2008. The main Anophelinae species collected were: *An. hervyi* (74%), *An. funestus* (21%) and *An. gambiae* sl (3%). Very low numbers of *An. pharoensis, An. rufipes* and *An. ziemanni* were also collected. The *An. hervyi* abundance varied from season to season (Table 1) and was more abundant during the rainy season (99.1% of captures), rarer during the dry and cold season and absent in the dry and hot season. *Anopheles hervyi* specimens were readily sampled by CDC light traps (97% of 8925 specimens), whereas only 2% of this species were caught by house spraying and 1% by human landing catches (Table 2). Using this last technique, 52% of *An. hervyi* were captured inside the houses. The yield of outdoor CDC light traps was far higher than indoor (100/1). Light traps were not used in the 1960s. The light trap collections in the current study showed that *An. hervyi* is locally very abundant. In the study site, it is found in sympatry with *An. gambiae* sl and *An. funestus*.

Compared with the local malaria vector species, *An hervyi* was more aggressive in the first half of the night (Fig. 2).

© 2009 Centre de Recherche Médicale et Sanitaire
Journal compilation © 2009 The Royal Entomological Society, *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/j.1365-2915.2009.00824.x

Table 2. Main species of Anopheles sampled in Guidimouni according to the methods.

	Landing catches				CDC light-traps				Spray catches	
Anopheline	Outdoor	%	Indoor	%	Outdoor	%	Indoor	%	Indoor	Total
An. hervyi	48	52.2	44	47.8	8610	99.2	68	0.8	155	8925
An. funestus	532	34.3	1020	65.7	308	65.5	162	34.5	541	2563
An. gambiae sl	98	45.2	119	54.8	26	86.7	4	13.3	147	394
Total	678	36.4	1183	63.6	8944	97.5	234	2.5	843	1188

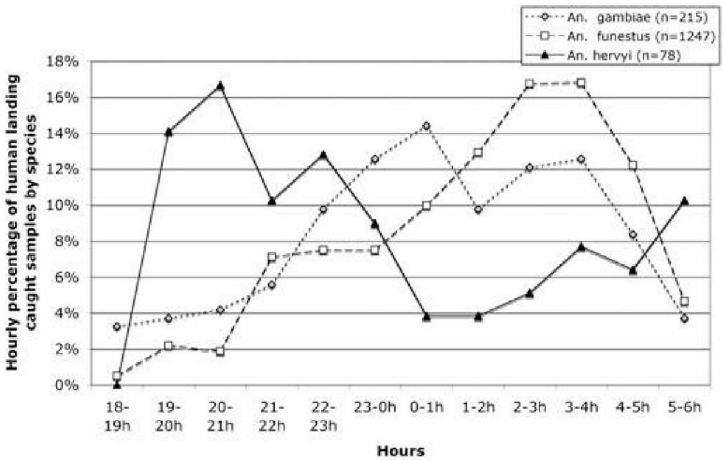


Fig. 2. Peak biting times of *Anopheles* in Guidimouni, Niger.

Anopheles hervyi was very abundant around human dwellings although the light trap data indicated a primarily exophilic behaviour. The relatively low catch rates of *An hervyi* from human landing catches compared with light traps suggested a limited role for this species in malaria transmission. This was confirmed by comparisons of the sporozoite indices between sympatric malaria vectors collected in the same village. The *An. hervyi* sporozoite index by circumsporozoite protein (CSP) ELISA was zero (95% confidence limits: 0–0.37%, 0/1000 tested specimens) whereas the *An. funestus* sporozoite index was 0.67% (95% CL: 0.27–1.37%, 7/1047) and the *An gambiae* sl index was 0.82% (95% CL: 0.02–4.48%, 1/122).

Anopheles hervyi was not found from comparable sampling captures carried out in 25 other localities widely distributed in Niger (Fig. 1). Its distribution thus seems very limited.

Anopheles larvae are being collected from different sites in the Guidimouni locality to identify the larval habitats of *An. hervyi*. The very limited distribution of this species in Niger suggests that characteristics of the Guidimouni lake zone may be an important determinant of the distribution of *An hervyi*. In this Niger region, this lake is famous for its water alkalinity and has survived climatic variations over long periods, at least since 12 000 BP (Gasse, 1987). *Anopheles hervyi* is morphologically similar to *An. salbai* and larvae of the latter species have been collected in salt waters in Somalia (Hamon *et al.*, 1963).

Although this study has found no evidence to suggest that *An. hervyi* is involved in malaria transmission in Niger the situation requires regular monitoring. Manmade changes, such as the oil factory project soon to be implemented in the study site, may have a profound effect on malaria vector systems.

Acknowledgements

The authors thank MR4 for providing ELISA *P. falciparum* products.

Authors' contributions

IJ and JBD designed the study; CC, DA and IA were responsible for ELISA assays; RL was responsible for field work. RL and JBD contributed to data analysis and writing the manuscript, All authors read and approved the final version. JBD is guarantor of the paper.

Funding

French Foreign Ministry through WHO (FSP RBM-Sahel), WHO-Afro (APW) from and Global Fund (Round IV Niger) through the International Federation of the Red Cross

Conflicts of interest

None declared

Ethical approval

By the National Ethics Committee of Niger

© 2009 Centre de Recherche Médicale et Sanitaire
Journal compilation © 2009 The Royal Entomological Society, *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/j.1365-2915.2009.00824.x

References

Brunhes, J., Venard, F., Diallo, B. & Dyemkouma, A. (1966) *Compte Rendu de la Prospection Entomologique Faite Dans l'est de la République du Niger du 6 Octobre au 7 Novembre*. Section "Entomologie" 1966 Rapport no 14/DOC/65, Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (OCCGE), Bobo-Dioulasso (Haute Volta).

Brunhes, J., Le Goff, G. & Geoffroy, B. (1999) Afro-tropical anopheline mosquitoes. III. Description of three new species: *Anopheles carnevalei* sp. nov., *An. hervyi* sp. nov., and *An. dualaensis* sp. nov., and resurrection of *An. rageaui* Mattingly and Adam. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **15**, 552–558.

Gasse, F. (1987) Diatoms for reconstructing palaeoenvironments and paleohydrology in tropical semi-arid zones. Example of some lakes from Niger since 12000 BP. *Hydrobiologia*, **154**, 127–163.

Hamon, J., Dyemkouma, A. & Ouedraogo, C.S. (1963) Présence en Afrique Occidentale d' *Anopheles argenteolobatus* et d' *A. salbaii* et nouvelles localités pour *A. dthali* et *A. rufipes* var. brucechwatti. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, **56**, 309–313.

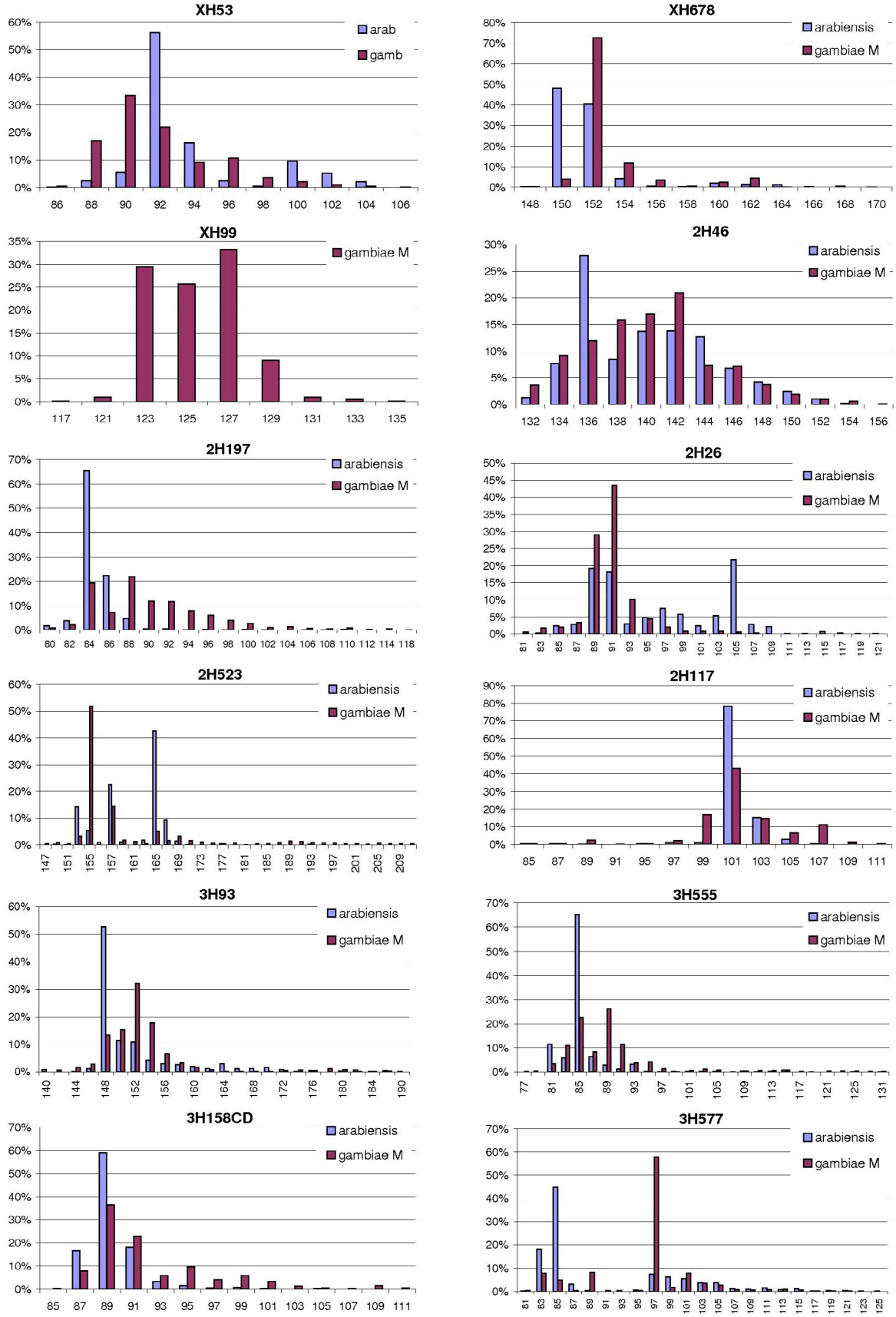
Hervy J.P., Le Goff G., Geoffroy B., Hervé J.P., Manga L. Brunhes J. (1998) *Les Anophèles de la Région Afro-tropicale. Logiciel d'identification et d'enseignement.* 1998 ORSTOM édition, série Didactiques, Paris, France (In French, English, Portuguese).

Wirtz, R.A., Burkot, T.R., Graves, P.M. & Andre, R.G. (1987) Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for P. falciparum and P. vivax sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua, New Guinea. *Journal of Medical Entomology*, **24**, 433–437.

Accepted 20 July 2009

© 2009 Centre de Recherche Médicale et Sanitaire
Journal compilation © 2009 The Royal Entomological Society, *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/j.1365-2915.2009.00824.x

Annexe 6. Fréquences alléliques des douze marqueurs microsatellites utilisés chez *An. arabiensis* et *An. gambiae* M, tous sites et années confondues.



Résumé

Une distribution nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action à destination des populations vulnérables du Niger a été effectuée fin 2005. Déjà montrée lors d'études pilotes à l'échelle du village, l'efficacité de cet outil dans le contrôle du paludisme restait à évaluer à l'occasion de vastes programmes opérationnels qui se multiplient en Afrique. Peu d'études des populations de vecteurs ont été publiées dans ce cadre. Nous avons mis en place un suivi entomologique au niveau de sites sentinelles répartis dans la zone Sahélienne du Niger, ayant couvert trois saisons de transmission, dont une avant intervention considérée comme période contrôle. Les paramètres entomologiques de la transmission ont été déterminés pour *An. gambiae* s.l., et la distribution spatiale des deux principaux vecteurs, *An. gambiae et An. arabiensis*, a été précisée. Le suivi temporel a mis en évidence une baisse globale du niveau de transmission de *P. falciparum,* probablement entrainée par la forte hausse d'utilisation de moustiquaires imprégnées. Cependant la hausse de la résistance des populations aux pyréthrinoïdes semble avoir été rapidement amorcée faisant craindre à moyen terme une perte d'efficacité de cet outil central des stratégies de lutte contre le paludisme. L'étude de la structure génétique des populations d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* à l'aide de marqueurs microsatellites a montré une homogénéité génétique dans l'espace, entre les villages, même séparés par plusieurs centaines de kilomètres, ainsi que dans le temps, entre la saison de transmission 2005 contrôle et la saison 2006 après distribution. Ces résultats ont suggéré qu'au cours de la première année d'intervention, la couverture en moustiquaires imprégnées atteinte n'a pas eu d'effet de masse suffisant pour entrainer une baisse de la diversité génétique ou une modification des fréquences allèliques des populations. La faible différenciation spatiale observée pourrait être expliquée par des échanges de gènes importants à l'intérieur de la zone d'étude, hypothèse appuyée par l'expansion rapide de la mutation *kdr* dans l'ensemble des sites où *An. gambiae* est présent. L'évaluation rigoureuse de tels programmes de contrôle permettra d'améliorer les outils de contrôle et par exemple de préserver l'efficacité des pyréthrinoïdes, seule classe d'insecticides actuellement disponible pour l'imprégnation des moustiquaires.

Abstract

A nationwide long-lasting insecticide-treated bed nets distribution targeting most vulnerable people was implemented throughout Niger in 2005. This malaria control tool is known for its efficiency in small scale pilot studies, however it is important to evaluate the effects of large operational programmes that are implemented in Africa. Noteworthy, few data are published on anopheline vector populations modification following such programmes. We performed entomological studies that included mosquito collections in sentinel sites accross the Sahelian zone of Niger during three transmission seasons, one control period before intervention and two after. Entomological parameters of malaria transmission were evaluated and the distribution of the two major vectors, *An. gambiae* and *An. arabiensis*, was determined. The temporal follow-up has shown a global decrease of malaria transmission level that may have resulted from the increase of pyrethroid treated nets use. The study of the *kdr* mutation however showed a rise of pyrethroid resistance in *An. gambiae* populations. This increase could lead in the near future to lower the efficiency of such nets as a major tool in malaria control strategies. The genetic structure of *An. gambiae* and *An. arabiensis* populations, studied with microsatellites markers, was highly homogenous in space between villages, and time, bewteen 2005 and 2006 transmission seasons. These results suggest that the net distribution did not impact significantly the genetic diversity and structure of vector populations in a single year. The low genetic differentiation among samples, within both species, indicated high gene flow across the area. This hypothesis is sustained by the fast expansion of the *kdr* mutation where *An. gambiae* is present, probably due to dispersion of adults. The evaluation of such control programmes will allow to identify potential improvements that could keep the efficiency of pyrethroids, the only insecticide class currently available for nets treatment.