

UNIVERSITE DE PARIS XII - VAL DE MARNE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XII-VAL DE MARNE

Discipline : Interactions Hôtes-Parasites, Entomologie Médicale

**Résistance d'*Anopheles gambiae* Giles et de *Culex pipiens*
quinquefasciatus Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et
implications opérationnelles**

par

Fabrice CHANDRE

Présentée et soutenue publiquement le 17 Novembre 1998 devant le Jury composé de :

M. R. HOUIN , Professeur, Université Paris XII-Val de Marne, Créteil	Président
Mme N. PASTEUR , Directeur de Recherches, CNRS, Univ. Montpellier II	Rapporteur
M. J.B. BERGE , Directeur de Recherches, INRA, Antibes	Rapporteur
M. J.M. HOUGARD , Directeur de Recherches, ORSTOM/OMS, Ouagadougou	Examineur
M. P. GUILLET , Directeur de Recherches, ORSTOM, Montpellier	Directeur de Thèse

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre des activités de recherches menées à l'Institut Pierre Richet de l'OCCGE (Bouaké, Côte d'Ivoire) et au Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles du Centre ORSTOM de Montpellier. Ils ont bénéficié de l'appui financier de divers organismes dont le Ministère de la Recherche (allocation MESR, n°92058). Ces recherches n'auraient pu être réalisées sans le concours et le soutien de nombreuses personnes que je souhaite tout particulièrement remercier.

Monsieur le Directeur Général de l'ORSTOM pour les facilités qu'il a bien voulu m'accorder au cours de la réalisation et la rédaction de ce travail.

Messieurs les Ministres de la Santé de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso ainsi que les autorités administratives et sanitaires de ces deux pays, sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à bien.

Monsieur le Secrétaire Général de l'OCCGE pour m'avoir accueilli à l'Institut Pierre Richet et permis de disposer de tous les moyens nécessaires à la réalisation de ces travaux.

Monsieur R. Houin, Professeur à l'Université Paris XII, qui m'a permis de suivre son enseignement du DEA Interactions Hôtes-Parasites, m'a soutenu lors de l'élaboration de ce programme de recherches et me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Monsieur P. Guillet, vous avez dirigé mes recherches mais surtout vous m'avez accordé votre confiance ce qui constitua un gage essentiel de motivation et d'encouragement. Vos qualités de chercheur m'ont permis de bénéficier largement de votre expérience dans le domaine de la lutte anti-vectorielle et de la résistance en ayant toujours à l'esprit l'aspect pratique opérationnel de ces recherches. Votre dynamisme et votre disponibilité à toutes les étapes de mes recherches ont largement contribué à la concrétisation de ce mémoire. Vos qualités humaines, enfin, sont à la base d'une véritable synergie qui s'est installée entre nous au cours de ces années. C'est donc avec un sentiment teinté de respect et d'une profonde amitié que je vous exprime ici toute ma reconnaissance.

Madame N. Pasteur, votre accueil chaleureux au sein du Laboratoire de Génétique et Environnement m'a permis de faire mes premiers pas en génétique des populations et de la résistance. Par la suite, vos conseils, votre rigueur et votre disponibilité de chaque instant ont été des atouts très précieux pour la réalisation de mes recherches. Je vous en remercie et suis très honoré que vous ayez accepté d'être rapporteur de ce travail.

Monsieur J.B. Bergé, votre intérêt pour nos recherches fut à l'origine d'une collaboration fructueuse et déterminante pour ces travaux et vous nous avez toujours réservé le meilleur des accueils dans votre laboratoire d'Antibes. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Monsieur J.M. Hougard, vous m'avez accueilli pour la première fois à l'ORSTOM au Cameroun. C'est en partie sous votre impulsion que j'ai poursuivi, cette première expérience de la recherche pour le développement, par un DEA puis une thèse. Je vous suis donc particulièrement reconnaissant d'avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur B. Philippon, Responsable de l'UR Santé, pour son appui et qui a contribué à ce que la réalisation de ce travail soit possible.

Monsieur J.L. Frézil, pour sa pertinence scientifique et la confiance qu'il m'a témoignée.

Monsieur C. Bellec pour ses encouragements et l'aide très appréciable qu'il m'a toujours accordée pendant la durée de ce travail.

Monsieur F. Rivière, pour son soutien constant, pas seulement limité au cadre professionnel, lorsqu'il était directeur de l'IPR. Il a su également me donner l'autonomie nécessaire à la réalisation de ce travail.

Monsieur F. Darriet, qui s'est pleinement investi dans nos études et a réalisé ces dernières années un remarquable travail sur le terrain auquel ces recherches doivent beaucoup, et en souvenir amical des missions que nous avons effectués ensemble.

Monsieur R. N'Guessan qui m'a assisté avec rigueur et dévouement tout au long mon séjour à Bouaké.

Mme S. Manguin, pour ses conseils, ses commentaires et son aide précieuse qui ont permis d'enrichir et d'améliorer nombre de nos articles

Monsieur J. Mouchet, pour m'avoir fait partager ses connaissances encyclopédiques sur le paludisme et la lutte antivectorielle.

Monsieur P. Carnevale, Directeur de l'IPR, pour ses conseils bienveillants, son appui et sa participation à ces travaux,

Messieurs A. Cuany, D. Martinez-Torres et D. Pauron pour leur aide et leur collaboration à certaines de ces études.

Messieurs M. Akogbeto, JMC. Doannio, O. Faye et L. Manga pour leur participation active à ces travaux,

Messieurs M. Tibayrenc et JP. Dujardin pour leur aide à la mise au point des techniques d'électrophorèse sur acétate

Mes collègues de l'IPR, les Docteurs PB. Diallo, S. Diarassouba, J. Dossou-Yovo, F. Fournet, MC. Henry, JP. Hervouët C. Laveissière, H. Méda, S. Traoré, P. Truc et Messieurs G. Chauvancy, A. Cisse, S. Ouedraogo, B. Koffi, A. Konate et V. Sanou pour leur aide, leurs nombreuses marques d'encouragements et le plaisir que nous avons eu à travailler ensemble au cours de mon séjour à Bouaké.

C'est une évidence mais qu'il convient toutefois de rappeler ici; la réussite de nos expériences repose avant tout sur la régularité avec laquelle se font les élevages de moustiques. Ce travail parfois fastidieux exige une grande rigueur, et je tiens à remercier particulièrement D. Boucharinc, M. Malivert, B. Sanou, et J. Ti A Hing de leur participation à cette tâche essentielle. Les moustiques demandent également à être nourris régulièrement, en cela, j'exprime toute ma reconnaissance à notre animalier, E. Perrotel, pour son dévouement sans faille envers les animaux qu'il entretient.

J'exprime toute ma gratitude aux autres collègues du LIN, N. Monteny, O. Skovmand, C. Brengues, M. Cavaleyra, S. Duchon, L. Finot, M. Darder et P. Kengne pour leur amitié ainsi que leur aide précieuse au cours de ces trois années.

Merci à tous les collègues et amis de l'ORSTOM qui de près ou de loin ont collaboré à ces études, et en particulier le personnel des services administratifs du centre de Montpellier.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire de Génétique et Environnement et plus particulièrement C. Chevillon, M. Marquine, D. Bourguet, et M. Raymond qui ont contribué à mon initiation à la génétique et avec lesquels les discussions ont permis à chaque fois d'enrichir mes connaissances dans ce domaine.

Merci à M. Guillet pour sa relecture attentive du manuscrit.

Je tiens à remercier les collègues du Laboratoire de Biologie Parasitaire du Museum National d'Histoire Naturelle qui m'ont accueilli pour ma thèse d'exercice puis pour mon DEA. En particulier le Professeur A.G. Chabaud, O. Bain et G. Petit qui ont largement contribué à mon initiation à la recherche et pour qui je garde une profonde estime. Je n'oublie pas non plus les collègues de ce laboratoire Laurence, Laetitia, Samuel, Moustapha et Pierre pour les bons moments passés ensemble.

Enfin je remercie mes maîtres de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Messieurs J. Bussiéras, R. Chermette et P. Bourdeau pour leur enseignement, et le goût qu'il m'ont transmis pour l'Entomologie et la Parasitologie.

A mes Parents, je n'aurai jamais assez de mots pour les remercier des lourds sacrifices qu'ils ont consenti et du soutien qu'il m'ont toujours accordé,

A Anne-Sophie et Stéphane,

A ma famille,

A mes amis,

A Nicole, Alice et Garance pour tout ce qu'elles m'apportent chaque jour et qui m'ont supporté au cours de ces derniers mois.

SOMMAIRE

1. Introduction	5
1.1. Les différents insecticides	8
1.1.1. Organochlorés	8
1.1.2. Organophosphorés	9
1.1.3. Carbamates	9
1.1.4. Pyréthrinoides	9
1.1.5. Régulateurs de croissance	10
1.1.6. Toxines bactériennes	10
1.2. Mécanismes de résistance	10
1.2.1. Résistance métabolique	11
1.2.1.1. Les estérases	11
1.2.1.2. Les mono-oxygénases à cytochrome P450	12
1.2.1.3. Les glutathion-S-transférases	12
1.2.2. Résistance par modification de la cible des insecticides	13
1.3. Lutte contre les moustiques	13
1.3.1. Lutte antilarvaire	14
1.3.2. Lutte imagocide	15
1.3.3. La protection individuelle et collective	16
2. <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>, moustique multi-résistant en Afrique de l'Ouest	19
2.1. Introduction	19
2.1.1. Le complexe <i>Culex pipiens</i> L.	19
2.1.2. <i>C. p. quinquefasciatus</i> en Afrique de l'Ouest	20
2.1.3. Résistance de <i>C. p. quinquefasciatus</i> en Afrique de l'Ouest	22
2.2. Présentation de l'étude	23
2.3. Distribution de la résistance aux organophosphorés et aux carbamates	25
2.4. Interactions des différents mécanismes de résistance aux organophosphorés et aux carbamates	31
2.5. Résistance aux pyréthrinoides	38
2.6. Conclusion: résistance de <i>C. p. quinquefasciatus</i> aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles	41
3. Structure des populations de <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> en Afrique de l'Ouest	45
3.1. Introduction	45
3.2. Matériel et Méthodes	46
3.2.1. Moustiques	46
3.2.2. Electrophorèses	46
3.2.3. Interprétation des résultats	48

3.3. Résultats	50
3.3.1. Description du polymorphisme enzymatique	50
3.3.1.1. Ecart à la panmixie	50
3.3.1.2. Déséquilibres de liaisons	53
3.3.2. Structure des populations de <i>C. p. quinquefasciatus</i>	53
3.3.2.1. Différenciation des populations	53
3.3.2.3. Echanges génétiques et distance géographique	55
3.4. Discussion	56
3.5. Conclusion	58
4. Résistance d'<i>Anopheles gambiae s.l.</i> aux pyréthrinoides	59
4.1. Introduction	59
4.1.1. Le complexe <i>An. gambiae</i> Giles 1902	59
4.1.2. <i>An. gambiae</i> et la résistance aux insecticides	61
4.2. Remarque préliminaire sur le dépistage de la résistance (épreuves OMS et doses diagnostiques)	63
4.3. Répartition de la résistance aux pyréthrinoides d' <i>An. gambiae s.l.</i> en Afrique	64
4.3.1. Mortalité au test OMS	65
4.3.2. Effet knockdown des pyréthrinoides	66
4.4. Le gène <i>kdr</i> , responsable de la résistance aux pyréthrinoides chez <i>An. gambiae</i>	67
4.4.1. Le canal Sodium voltage dépendant	67
4.4.2. Séquence du CNaVdp et test diagnostique de la mutation <i>kdr</i>	69
4.4.3. Conclusion	71
4.5. Résistance croisée induite par le gène <i>kdr</i>	73
4.6. Impact du gène <i>kdr</i> sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées	76
4.6.1. Niveau de résistance conférée par la mutation <i>kdr</i> chez les femelles d' <i>An. gambiae s.s.</i>	77
4.6.2. Effet knockdown et mortalité au test OMS.	78
4.6.3. Effet irritant des pyréthrinoides	79
4.6.4. Résistance et efficacité des moustiquaires imprégnées	81
4.7. Résistance et formes chromosomiques d' <i>An. gambiae s.s.</i>	84
4.8. Conclusion: résistance d' <i>An. gambiae s.s.</i> aux pyréthrinoides et implications opérationnelles	86
5. Conclusions et perspectives	89
Références	99

Liste des Annexes

- Article 1** - Guillet P., Chandre F., Mouchet J. 1997. L'utilisation des insecticides en santé publique: états et perspectives. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 27: 552-557.
- Article 2** - Chandre F., Darriet F., Doannio J.M.C, Rivière F., Pasteur N., Guillet P. 1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *Journal of Medical Entomology*. 34: 664-671.
- Article 3** - Chandre F., Bourguet D., Pasteur N., Guillet P. Interaction of multiple organophosphate and carbamate resistance genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* from West Africa. (en préparation).
- Article 4** - Chandre F., Darriet F., Darder M., Cuany A., Doannio J.M.C., Pasteur N., Guillet P. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* from West Africa. *Medical & Veterinary Entomology*. 12: 359-366.
- Article 5** - Chandre F., F. Darriet, L. Manga, M. Akogbeto, O. Faye, J. Mouchet, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae s.l.* *Bulletin of the World Health Organization*. 77: sous presse.
- Article 6** - Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Bergé J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N., Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Molecular Biology*. 7:179-184.
- Article 7** - Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., Carnevale P., Guillet P. 1998. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15: sous presse.
- Article 8** - Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S., Guillet P. 1998. Modifications of pyrethroid effects induced by *kdr* mutation in *An. gambiae s.s.* *Medical & Veterinary Entomology*. (soumis).

Liste des abréviations utilisées

AChE	Acétylcholinestérase
<i>Ace.1^R</i>	allèle codant pour une AChE1 résistante aux insecticides
CL ₅₀	Concentration Létale entraînant la mort de 50% des individus
CNaVdp	Canal Sodium Voltage dépendant
DDT	Dichloro diphényl trichloréthane
DEF	S-S-S Tributyl phosphorotrithioate
ECOD	Ethoxycoumarine dé-éthylase
<i>kdr</i>	Knockdown resistance
KdT	Temps de knockdown
PBO	Piperonyl butoxide
PASA	Polymorphism of allele specific amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
pb	paire de bases
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RR ₅₀	Resistance Ratio à la CL ₅₀
SS; RS; RR	Homozygote sensible; Hétérozygote; Homozygote résistant

1. Introduction

Article 1 - Guillet P., Chandre F., Mouchet J. 1997. L'utilisation des insecticides en santé publique: états et perspectives. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 27: 552-557.

Cette introduction reprend une partie des éléments présentés dans l'article mais concerne plus particulièrement la résistance et la lutte contre les moustiques.

Dans son dernier rapport sur l'état de la santé dans le monde, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'un tiers des décès annuels est imputable à des causes infectieuses ou parasitaires (WHO, 1998). Parmi ceux-ci, 18% concernent des maladies transmises par les arthropodes. Lorsqu'elles ne sont pas mortelles, elles occasionnent de graves invalidités ou diminuent de façon significative l'espérance de vie des personnes infectées (onchocercose, leishmaniose cutanéomuqueuse, filariose lymphatique...). Les insectes qui propagent ces maladies appartiennent à plusieurs ordres mais sont tous caractérisés par leur comportement hématophage. Parmi eux, les moustiques (Diptera: Culicidae) avec environ 3000 espèces répertoriées, constituent la plus importante famille de vecteurs d'agents pathogènes (Rodhain et Perez, 1985). Ils assurent la transmission du paludisme, des fièvres hémorragiques (fièvre jaune, dengue), des filarioses lymphatiques et de nombreuses arboviroses.

La prévention des maladies transmises par les arthropodes en général, et les moustiques en particulier, peut faire appel à la vaccination, la chimioprophylaxie et aux mesures de lutte antivectorielle au sens large. Pour le moment, seuls les vaccins contre la fièvre jaune et l'encéphalite japonaise sont disponibles. Compte tenu de la résistance de

Plasmodium falciparum aux antimalariques, la chimioprophylaxie du paludisme n'est envisageable que dans certains cas particuliers (voyageurs, femmes enceintes). La lutte antivectorielle reste donc le principal moyen de prévention contre ces affections. Elle a pour objectifs de réduire la mortalité et la morbidité par le contrôle de la transmission (WHO, 1995). Les opérations de lutte sont basées avant tout sur l'utilisation d'insecticides chimiques ou d'origines bactériennes, parfois complétées par des mesures d'aménagement de l'environnement ou de contrôle biologique.

Au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale l'utilisation massive des insecticides chimiques en agriculture et en santé publique, s'est rapidement heurtée au problème de la résistance. Dès 1946, on observe une résistance au DDT chez les moustiques *Culex pipiens* et *Aedes sollicitans* (Metcalf, 1989). Depuis une cinquantaine d'années, le nombre d'insectes résistants s'est considérablement accru. On en compte actuellement plus de 500 espèces dont 25% sont des moustiques (Shidrawi, 1990; Roberts et Andre, 1994).

La résistance est définie par l'OMS comme "l'apparition dans une population, d'individus possédant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce" (Hamon et Mouchet, 1961). Avant que des techniques biochimiques et moléculaires ne permettent l'identification et le suivi des mécanismes de résistance, les responsables de programme de lutte ont longtemps considéré que la résistance était le niveau à partir duquel on commençait à observer des échecs de traitements sur le terrain. Cette situation a conduit à augmenter les doses opérationnelles et lorsque cela n'était plus possible à rejeter l'insecticide voire même parfois tous ceux de la même famille au profit de produits souvent plus chers. Cette attitude bien que pragmatique en apparence, ne peut plus être envisagée de nos jours, compte tenu des risques qu'elle engendre pour l'environnement et du nombre limité d'insecticides actuellement disponibles. La lutte contre un insecte se conçoit désormais dans le contexte d'une approche intégrée visant entre autres, à prévenir, retarder, ou limiter l'impact de la résistance dont l'apparition est malheureusement de règle dans la plupart des cas.

La résistance est un caractère héréditaire dont l'évolution dans les populations d'insectes repose sur la sélection d'allèles apparus soit par mutation spontanée, soit par migration. Pour envisager une "gestion" de la résistance, il est indispensable de connaître la nature des mécanismes impliqués, leur mode de transmission et de dispersion dans les populations d'insectes. Pour cela, il faut disposer d'outils qui puissent les identifier et les détecter le plus tôt possible dans les populations naturelles. Ces outils (biochimiques, moléculaires) doivent permettre de caractériser les mécanismes de résistance à l'échelle de l'individu afin de suivre leur évolution au sein des populations et d'étudier leur interaction éventuelle avec d'autres gènes de résistance (résistance plurifactorielle). Ces tests doivent toutefois être constamment reliés à des essais biologiques pratiqués en laboratoire et sur le terrain qui eux seuls permettent, pour le moment, de quantifier le niveau et l'impact de la résistance dans une population d'insectes. Pour évaluer le risque d'apparition d'une résistance dans une population traitée et son évolution, il faut également connaître certains caractères biologiques du vecteur et plus particulièrement la structure de ses populations ainsi que l'intensité des flux géniques qui s'y opèrent.

C'est sur la base de ces objectifs que nous avons étudié la résistance aux insecticides chimiques et ses implications opérationnelles chez deux espèces majeures de moustiques d'Afrique de l'Ouest.

Dans un premier temps nos travaux ont porté sur *Culex pipiens quinquefasciatus* espèce pan-tropicale dont les capacités d'adaptation aux changements de milieu sont particulièrement efficaces. La résistance de ce moustique vis à vis des principales familles d'insecticides chimiques a été étudiée à l'échelle de la Côte d'Ivoire et du Burkina Faso (chapitre 2). Afin d'évaluer les modalités de dispersion des gènes de résistance nous avons étudié la structure des populations de ce moustique et estimé l'intensité des flux géniques à partir du polymorphisme des gènes neutres (chapitre 3). L'étude de *C. p. quinquefasciatus* a également été entreprise dans le but d'acquérir les bases méthodologiques nécessaires pour aborder la question de la résistance aux pyréthrinoides d'*An. gambiae s.l.*, vecteur majeur du paludisme en Afrique (chapitre 4). Cette résistance est extrêmement préoccupante car les pyréthrinoides sont les seuls

insecticides actuellement disponibles pour l'imprégnation des moustiquaires qui constituent un outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire. Cette étude concerne à la fois l'analyse du mécanisme au niveau moléculaire et les modifications qu'il induit dans la réponse du moustique à leurs effets toxiques.

Quelques généralités communes aux différentes parties de cet exposé sont présentées dans la suite de cette introduction.

1.1. Les différents insecticides

Bien qu'il existe plusieurs centaines de molécules, la plupart des insecticides se regroupent au sein de six grandes familles.

1.1.1. Organochlorés

Cette famille est classiquement subdivisée en trois sous-groupes selon leur structure chimique et leur mode d'action, le DDT et ses analogues, le lindane, et enfin les cyclodiènes.

La découverte des propriétés insecticides du DDT, en 1939, constitua une véritable révolution dans la lutte contre les insectes. Il fut très largement utilisé en agriculture et en santé publique, où il contribua à sauver des millions de vies humaines (Mouchet, 1994). Les succès prometteurs obtenus dès les premiers traitements furent à la base du lancement par l'OMS du programme mondial d'éradication du paludisme dans les années 50. Le DDT agit sur le système nerveux périphérique et central des insectes (Hassal, 1990). Son action est rapide et se traduit par un effet de choc (knockdown) réversible aux doses sub-léthales. Malgré l'efficacité du DDT, son accumulation dans l'environnement et les chaînes alimentaires, et l'apparition de résistance ont entraîné son abandon voire même son interdiction dans de nombreux pays.

Le lindane et les cyclodiènes agissent sur le système nerveux central. Ils inhibent les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui joue un

rôle de neuroméiateur inhibiteur. Ces insecticides ont été largement employés dans les années 50-60, mais leur toxicité pour la faune non cible, leur rémanence dans l'environnement et surtout l'apparition très rapide de résistance ont conduit à leur abandon.

1.1.2. Organophosphorés

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique. Moins toxiques que les précédents, ils les ont progressivement remplacés dans les années 50 et sont toujours assez largement utilisés. Les formes oxydées des organophosphorés (oxon) sont de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Cette enzyme dégrade l'acétylcholine, qui agit comme neuroméiateur des synapses cholinergiques, localisées dans le système nerveux central chez les insectes. La fixation des organophosphorés sur l'acétylcholinestérase entraîne l'accumulation d'acétylcholine dans la jonction synaptique. Lorsque sa concentration devient trop forte, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte induisant la paralysie puis la mort de l'insecte.

1.1.3. Carbamates

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. Comme les organophosphorés, ils inhibent l'acétylcholinestérase. Compte tenu de leur coût et de leur toxicité sur les mammifères, ils sont peu utilisés en santé publique.

1.1.4. Pyréthrinoides

Les pyréthrinoides sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs de chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Les pyréthrinoides de première génération, peu rémanents car photolabiles, entrent dans la composition des aérosols et des tortillons fumigènes. Par la suite l'industrie a produit des molécules plus efficaces et plus stables, qui ont permis d'envisager leur utilisation en applications rémanentes (Elliott *et al.*, 1978). Ces insecticides sont classés en deux

groupes selon qu'ils possèdent un groupement cyané en α de la liaison ester (groupe II: deltaméthrine, lambda-cyhalothrine...) ou non (groupe I: perméthrine).

Les pyréthrinoides agissent sur la même cible que le DDT, induisant rapidement un effet knockdown. Ils possèdent des propriétés excito-répulsives et sont peu toxiques pour les mammifères aux doses opérationnelles. C'est pourquoi ce sont actuellement les seuls insecticides utilisables pour l'imprégnation des moustiquaires ou des rideaux, destinés à lutter contre les vecteurs piquant l'homme la nuit, notamment ceux du paludisme.

1.1.5. Régulateurs de croissance

Ce sont des analogues d'hormones de croissance des insectes. Les juvénoïdes (méthoprene, pyriproxifen) inhibent la nymphose alors que les ecdysoïdes (diflubenzuron) inhibent la synthèse de la chitine au moment de la mue.

1.1.6. Toxines bactériennes

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

1.2. Mécanismes de résistance

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec des cibles biologiques présentes chez l'insecte. Plusieurs étapes sont nécessaires avant que l'insecticide n'exerce son action, il doit entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans l'organisme, dans certains cas être transformé en métabolite actif, puis être transporté jusqu'à la cible avec laquelle il interagit. Chacune de ces étapes est sous la dépendance d'un ou plusieurs gènes. Tout mécanisme qui modifie l'une de ces étapes peut donc conduire à une résistance (Soderlund et Bloomquist, 1990). Celle-ci peut impliquer une modification du

comportement de l'insecte qui évite ainsi le contact avec l'insecticide (résistance comportementale), une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, une modification des voies métaboliques permettant sa dégradation (résistance métabolique) ou enfin, une modification de sa cible.

Les changements comportementaux et les modifications de l'absorption des insecticides ou de leur excrétion sont des mécanismes rares et dont la contribution réelle à la résistance est souvent difficile à mettre en évidence. En pratique, les fortes résistances sont associées à des mécanismes métaboliques ainsi qu'à des modifications de cible.

1.2.1. Résistance métabolique

La résistance métabolique correspond à un accroissement des processus de dégradation qui interviennent dans le métabolisme normal des insecticides. Elle peut résulter d'une augmentation de la quantité d'enzymes (surproduction) ou d'une meilleure efficacité catalytique de l'enzyme (mutations ponctuelles). Trois classes d'enzymes interviennent dans la résistance métabolique aux insecticides chimiques.

1.2.1.1. Les estérases

Les estérases non spécifiques sont l'un des principaux mécanismes de résistance aux organophosphorés. Elles ont été particulièrement bien étudiées chez le complexe *C. pipiens* depuis leur détection dans les populations du sud de la France (Pasteur, 1977) et de Californie (Georghiou et Pasteur, 1978). Ces enzymes sont surproduites et peuvent représenter jusqu'à 12% des protéines totales de l'insecte (Fournier *et al.*, 1987). Elles sont classées en deux groupes, A et B, selon qu'elles hydrolysent préférentiellement l' α - ou le β -naphthyl acétate. Elles sont codées par deux loci¹ A et B situés à proximité sur le même chromosome (Pasteur *et al.*, 1981). Leur surproduction est associée soit à une

¹ Deux estérases surproduites (C1, C2) codées par un troisième locus C ont été récemment observées dans des populations de *C. p. pipiens* en France (Raymond et Marquine, 1994) et de *C. p. quinquefasciatus* dans les Caraïbes (Yébakima *et al.*, 1995a; 1995b) et en Afrique de l'Ouest (notre étude, chapitre 2). Ces estérases hydrolysent préférentiellement l' α -naphthyl acétate et auraient également un rôle dans la résistance aux organophosphorés.

augmentation du nombre de copies du gène (amplification génique), soit à un mécanisme de régulation de l'expression du gène (Mouchés *et al.*, 1986; Rooker *et al.*, 1996). Elles n'agissent pas par hydrolyse mais en séquestrant les organophosphorés vis à vis desquels elles possèdent une très forte affinité (Cuany *et al.*, 1993). Chez d'autres insectes comme le puceron, *Myzus persicae*, ces estérases confèrent également une résistance aux carbamates et aux pyréthrinoides (Devonshire et Moores, 1982).

Une estérase non surproduite est spécifique de la résistance au malathion chez *An. arabiensis*, *An. culicifacies*, *An. stephensi* et *C. tarsalis* (In Hemingway, 1998). Contrairement aux estérases précédentes qui sont exprimées à tous les stades de développement de l'insecte, la malathion carboxylestérase ne serait présente que chez les adultes.

1.2.1.2. Les mono-oxygénases à cytochrome P450

Ces enzymes regroupent plusieurs familles de gènes intervenant toutes dans des réactions d'oxydation. Elles sont principalement impliquées dans la résistance aux pyréthrinoides et dans une moindre mesure, aux autres insecticides (Scott, 1996; Soderlund et Bloomquist, 1990). Chez les insectes la plupart des oxydases associées à la résistance appartiennent à la même famille (*CYP6*). Dans les souches résistantes on observe généralement une surproduction d'enzymes mais il est probable que des mutations ponctuelles modifient l'efficacité enzymatique de certaines oxydases (Feyereisen *et al.*, 1995; Brun, 1997).

1.2.1.3. Les glutathion-S-transférases

Elles permettent la conjugaison des insecticides avec la forme réduite du glutathion formant ainsi des métabolites moins toxiques. L'enzyme la plus importante de ce groupe, la DDT-ase, intervient spécifiquement dans la dégradation du DDT. Chez *Ae. aegypti* il existe deux formes de GST dont la surproduction confère une résistance au DDT (Grant et Matsumura, 1989). Chez *An. gambiae*, sept GST différentes ont été

identifiées, la résistance au DDT étant associée à des changements quantitatifs et qualitatifs de certaines de ces enzymes (Prapanthadara *et al.*, 1995a; 1995b).

1.2.2. Résistance par modification de la cible des insecticides chimiques

Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux, acétylcholinestérase, canal Sodium voltage dépendant, récepteur GABA. Toute modification structurale diminuant leur affinité avec les insecticides peut induire une résistance. Ces mécanismes sont généralement très efficaces et confèrent de plus une résistance croisée à tous les insecticides qui agissent sur la même cible. Cette résistance est associée à une ou plusieurs mutations ponctuelles sur la séquence codant pour les protéines concernées. Pour le récepteur GABA et le canal Sodium, les mêmes mutations ont été retrouvées chez plusieurs espèces différentes (Coustau et Ffrench-Constant, 1995; Williamson *et al.*, 1996a; Martinez-Torres *et al.*, 1997). L'existence d'une réponse identique chez différents insectes face à un insecticide donné indique que les mutations compatibles à la fois avec la résistance et les contraintes fonctionnelles de ces protéines, sont probablement limitées.

1.3. Lutte contre les moustiques

De nombreuses méthodes sont utilisables pour lutter contre les moustiques, mais pour répondre à des critères d'efficacité et de sélectivité, la lutte doit tenir compte avant tout de la bio-écologie et du comportement des espèces cibles ainsi que du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission (WHO, 1995). En fonction de ces éléments elle peut se pratiquer à différents niveaux:

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

1.3.1. Lutte antilarvaire

La lutte contre les larves de moustiques n'est envisageable que lorsque les principaux gîtes sont en nombre limité, facilement repérables et accessibles.

C'est la principale méthode pour lutter contre les moustiques du complexe *C. pipiens* dont les larves se développent dans les eaux polluées associées aux activités humaines (fosses septiques, vides sanitaires, caniveaux, puisards...). En milieu urbain, la méthode de lutte la plus efficace à long terme est basée surtout sur la réduction des gîtes par des mesures d'assainissement. Cependant, elle est difficilement envisageable dans de nombreux pays tropicaux étant donné l'urbanisation anarchique et le peu de moyens dont disposent les autorités municipales. Elle fait donc appel en premier lieu aux larvicides dont les plus employés restent les organophosphorés (malathion, chlorpyrifos, fénitrothion, fenthion...) du fait de leur rémanence dans les milieux riches en matières organiques. Depuis quelques années, l'efficacité d'une bactérie *Bacillus sphaericus* a été démontrée dans le cadre de campagnes de lutte à grande échelle contre *C. p. pipiens* et *C. p. quinquefasciatus* tant en France (Sinègre *et al.*, 1993), qu'en Afrique (Baldet, 1995; Barbazan *et al.*, 1997) en Inde ou en Amérique Latine. Les régulateurs de croissance sont encore au stade de l'expérimentation mais des résultats intéressants ont été obtenus sur *C. p. quinquefasciatus* en Amérique du Nord (Mulligan III et Schaefer, 1990) et en Afrique (Darriet *et al.*, 1987; Chavasse *et al.*, 1995).

L'élimination des gîtes domestiques et péri-domestiques à *Ae. aegypti* est simple en théorie mais difficile à mettre en œuvre. Elle nécessite une participation active des communautés or ces moustiques ne représentent pas une forte nuisance. Les traitements larvicides font éventuellement appel au téméphos, utilisable dans l'eau de boisson et dans une moindre mesure à *Bacillus thuringiensis israelensis* ou au methoprène. Si la lutte antivectorielle reste le seul outil de prévention et d'intervention contre la dengue, on apprécie paradoxalement très mal l'impact des traitements insecticides sur l'évolution de la maladie (déclenchement et évolution des épidémies).

L'assainissement et le drainage des zones marécageuses ont été les principales méthodes de lutte contre les vecteurs du paludisme avant l'avènement des insecticides chimiques (Mouchet *et al.*, 1991). En Afrique, du fait de la multiplicité des gîtes potentiels, la lutte contre les larves d'anophèles n'est pas applicable sauf dans certains cas très particuliers (zones urbaines et péri-urbaines). Le téméphos est dans ce cas le principal larvicide employé (Carnevale et Mouchet, 1990).

1.3.2. Lutte imagocide

Les aspersions intradomiciliaires d'insecticides rémanents sont particulièrement bien adaptées pour lutter contre les vecteurs du paludisme qui ont un comportement endophile. Le DDT bien qu'il soit efficace et bon marché a été progressivement abandonné pour d'autres adulticides notamment les pyréthrinoides (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine...) et les organophosphorés (malathion, fénitrothion, pirimiphos methyl...). D'autres produits sont également efficaces tels que certains carbamates comme le propoxur et le bendiocarbe (Carnevale et Mouchet, 1990).

Les traitements intradomiciliaires ne sont pas employés en routine contre les *Aedes* et les *Culex*; toutefois dans le cadre de la lutte antipaludique, ils peuvent réduire leurs densités à l'intérieur des habitations ainsi que celle d'autres espèces nuisibles (cafards, mouches, punaises de lit...).

Les pulvérisations spatiales extradomiciliaires de pyréthrinoides ou d'organophosphorés sont considérées avant tout comme des mesures d'urgence applicables lors de flambées épidémiques (paludisme, arboviroses). Elles n'ont cependant aucune rémanence, sont coûteuses, peu sélectives et nécessitent l'intervention de structures spécialisées bien équipées. Elles présentent une certaine efficacité pour faire chuter rapidement les niveaux de transmission.

1.3.3. La protection individuelle et collective

Les moustiquaires sont utilisées depuis longtemps pour se protéger des piqûres d'insectes. Toutefois, elles n'assurent pas une protection parfaite car elles n'empêchent pas les moustiques de se nourrir sur les parties du corps au contact du tulle. Elles sont même d'excellents pièges à moustiques lorsqu'elles sont mal utilisées ou qu'après un certain temps d'utilisation, elles commencent à être trouées. Enfin, elles tendent à détourner les moustiques vers les personnes qui ne sont pas protégées.

Leur utilisation a connu un regain d'intérêt avec les premiers essais d'imprégnation à l'aide de pyréthrinoides (Darriet *et al.*, 1984). Les essais en cases expérimentales ont montré que l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides se situait à plusieurs niveaux (Carnevale *et al.*, 1988; Darriet, 1991). Elles entraînent généralement une diminution importante du nombre de moustiques qui pénètrent dans les habitations; elles réduisent les taux de femelles gorgées même lorsque les moustiquaires sont trouées ou mal bordées; et elles augmentent le pourcentage des femelles qui s'échappent des maisons (exophilie induite). L'effet létal sur les moustiques n'est qu'une des composantes de l'action des moustiquaires imprégnées et il est variable selon l'insecticide utilisé.

Les moustiquaires imprégnées entraînent donc une réduction importante du contact homme-vecteur et ont un effet délétère sur la survie et la fécondité des vecteurs anthropophiles. Utilisées à l'échelon d'une communauté, les moustiquaires imprégnées constituent une méthode efficace de prévention contre le paludisme (Robert *et al.*, 1989a). Certaines études menées au Burkina Faso (Robert et Carnevale, 1991), au Zaïre (Karch *et al.*, 1993) et au Kenya (Beach *et al.*, 1993) ont montré que l'utilisation des moustiquaires imprégnées entraînait une réduction de la transmission de l'ordre de 80 à 98% (nombre de piqûres infectées/homme/an). Cette réduction s'explique généralement par la diminution de la densité et de la longévité des vecteurs, ainsi que des indices sporozoïtiques. Sur le plan épidémiologique, les moustiquaires imprégnées abaissent les fortes charges parasitaires et diminuent en moyenne de 50% l'incidence de la morbidité palustre chez les enfants (Choi *et al.*, 1995). Plusieurs études montrent que l'utilisation

des moustiquaires imprégnées est associée à une réduction moyenne de la mortalité infantile de l'ordre de 20-30% (Lengeler *et al.*, 1997). En Gambie, une réduction de la mortalité globale des enfants de 1 à 4 ans d'environ 60% a été observée (Alonso *et al.*, 1993).

L'efficacité des moustiquaires imprégnées dont nous reparlerons au cours des chapitres suivants se situe donc à deux niveaux qu'il convient de bien distinguer:

- à l'échelle de l'individu, elles protègent ceux qui les utilisent en repoussant les moustiques ou en les empêchant de piquer (protection individuelle),
- à l'échelle d'une communauté, elles réduisent les densités de vecteurs et la transmission du paludisme (protection collective), à condition d'avoir une bonne couverture (au moins 80%), un insecticide efficace et que les moustiques soient sensibles.

Contrairement aux autres méthodes de lutte, l'acquisition de la moustiquaire et son imprégnation peuvent être prises en charge par les communautés elles-mêmes à condition que les prix soient abordables et qu'un effort d'éducation sanitaire soit entrepris pour que leur utilisation résulte d'une décision intentionnelle (Rozendaal, 1989; Mouchet *et al.*, 1991). Toutefois, l'acceptation de la moustiquaire se fera avant tout sur la protection qu'elle confère contre les autres insectes responsables de nuisance tels que les *Culex*, les punaises, les poux, les blattes... (Lines, 1997). Cet aspect est particulièrement important en milieu urbain où le principal agent de nuisance est *C. p. quinquefasciatus*. Lors de la mise en place en zone urbaine d'un programme antipaludique basé sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées, il sera donc nécessaire de tenir compte de leur impact sur la nuisance engendrée par ce moustique, par ailleurs fréquemment résistant aux pyréthrinoides.

2. *Culex pipiens quinquefasciatus*, moustique multi-résistant en Afrique de l'Ouest

2.1. Introduction

2.1.1 Le complexe *Culex pipiens* L.

Le complexe *C. pipiens* L., 1758 regroupe plusieurs formes dont les statuts taxinomiques ont fait l'objet de nombreuses controverses (voir les revues de Barr, 1982; Harbach *et al.*, 1985). Celles-ci résultent en partie d'une forte variabilité bio-écologique et comportementale au sein du complexe ainsi que de l'existence d'incompatibilités cytoplasmiques qui se traduisent par la stérilité de certains croisements entre populations. Selon Barr (1982) le complexe *C. pipiens* est composé de deux sous-espèces *C. pipiens pipiens* et *C. pipiens quinquefasciatus*.

C. p. pipiens est présent dans les régions tempérées ainsi qu'en altitude dans certaines zones d'Afrique tropicale. Dans les régions tempérées, on oppose parfois *C. pipiens* pour désigner les populations rurales, ornithophiles et anautogènes, colonisant les gîtes épigés, à *C. molestus* Forskål 1775 pour les populations urbaines, anthropophiles, et autogènes vivant dans les gîtes hypogés. Toutefois, ces deux entités ne sont pas génétiquement isolées et l'existence d'un fort brassage entre les populations de *C. pipiens* et *C. molestus* montre qu'il s'agit en fait de deux écotypes de la même forme (Pasteur, 1977; Harbach *et al.*, 1984; Rivet, 1992; Chevillon *et al.*, 1995a).

C. p. quinquefasciatus Say, 1823 (*C. p. fatigans* Wiedemann, 1828) est présent dans toute la ceinture tropicale et subtropicale du globe. Dans certaines régions (Amérique du Nord, Sud-Est Asiatique, Australie, Madagascar) les aires de répartition des deux sous-espèces se chevauchent, et l'on trouve des formes intermédiaires entre *C. p. pipiens* et *C. p. quinquefasciatus* (Barr, 1982; Urbanelli *et al.*, 1995). Ces hybrides ont parfois été à tort élevés au rang de sous-espèces, comme *C. p. pallens* Coquillet 1898 au Japon et *C. p. australicus* Dobrotworsky et Drummond 1953 en Australie.

Les seuls critères morphologiques fiables pour différencier *C. p. pipiens* et *C. p. quinquefasciatus* portent sur les caractères morphométriques des pièces génitales mâles (Sundararaman, 1949 In Laven, 1967). Leurs populations peuvent également être séparées par électrophorèse des protéines, sur des différences de fréquences alléliques à certains locus enzymatiques ou sur certains locus discriminants (Urbanelli *et al.*, 1985). Récemment, des techniques de biologie moléculaire ont mis en évidence des marqueurs diagnostiques de ces deux sous-espèces (Severini *et al.*, 1996; Crabtree *et al.*, 1997; Bourguet *et al.*, 1998). La présence d'hétérozygotes aux locus discriminants et les clines de fréquences alléliques observés dans les zones d'hybridation témoignent cependant de l'existence de flux géniques importants entre *C. p. quinquefasciatus* et *C. p. pipiens*. Dans le cadre de la résistance, ces flux géniques revêtent une importance particulière puisqu'ils permettent le passage de gènes de résistance d'une sous espèce à l'autre (Raymond *et al.*, 1991).

2.1.2. *C. p. quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest

C. p. quinquefasciatus est largement répandu en Afrique sub-saharienne. Il n'a pas de rôle vecteur en Afrique de l'Ouest ainsi qu'en Afrique Centrale mais il engendre en revanche partout une forte nuisance en milieu urbain. En Afrique de l'Est, il est vecteur de la filariose lymphatique à *Wuchereria bancrofti* (Hamon *et al.*, 1967).

C. p. quinquefasciatus est une espèce particulièrement adaptée au milieu urbain tropical. Ses larves se développent dans les eaux polluées et riches en matières

organiques. Les collections d'eaux usées issues des activités humaines (caniveaux, fosses septiques, puisards...) constituent l'essentiel de ses gîtes larvaires. Il est également capable de coloniser des eaux peu polluées (pneus, flaques d'eaux stagnantes) où il est souvent associé à d'autres espèces (Subra, 1981). Les femelles sont très anthropophiles et dans une moindre mesure, ornithophile. Ce comportement lui permet de se détourner vers les oiseaux et de se maintenir à des densités élevées même lorsque son accès à l'homme est réduit, par exemple par les moustiquaires imprégnées (Bogh *et al.*, 1998). Les femelles se nourrissent la nuit et sont partiellement endophages. Après le repas sanguin la plupart d'entre elles restent au repos dans les habitations, puis tendent à les quitter au fur et à mesure que la digestion et la maturation ovarienne avancent (Subra, 1970; 1972).

En Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale, *C. p. quinquefasciatus* représente, comme ailleurs, la principale espèce de moustique urbain. Cette situation dans cette partie de l'Afrique est assez récente et a considérablement évolué au cours du 20^{ème} siècle (Hamon *et al.*, 1967). Au début du siècle, *C. p. quinquefasciatus* n'était présent et en faibles densités que dans quelques agglomérations situées essentiellement sur le pourtour Atlantique. Sa progression vers l'intérieur des terres s'est faite dans les années 50 et a été accélérée par l'anthropisation rapide du milieu urbain et l'utilisation des insecticides organochlorés (Subra, 1981). A Abidjan en 1954, *C. p. quinquefasciatus* représentait la deuxième espèce après *Ae. aegypti* et à Bouaké, en 1956, la troisième espèce rencontrée dans les gîtes larvaires derrière *C. cinereus* et *C. decens* (Binson et Doucet, 1956; Hamon *et al.*, 1967). A la même époque, il n'était connu au Burkina Faso que des villes de Ouagadougou et Bobo-Dioulasso ainsi que de quelques villages alentours (Hamon *et al.*, 1958).

Après les années 50, l'accroissement de la population et l'exode rural ont accéléré le processus d'urbanisation en Afrique. Celle-ci s'est faite le plus souvent de façon anarchique sans que les infrastructures de collecte et d'évacuation des eaux usées n'aient été adaptées, entraînant ainsi la multiplication des collections d'eau polluées favorables à la prolifération de cette espèce. Selon Service (1966) c'est l'usage des insecticides qui est directement responsable de l'implantation de *C. p. quinquefasciatus*. Cette espèce

ayant développé très tôt une résistance aux organochlorés a remplacé les autres moustiques avec lesquels elle entrait en compétition mais qui, sensibles, ont été progressivement éliminés par les traitements. Toutefois, cette seule hypothèse ne suffit pas à expliquer sa pullulation notamment dans les zones non traitées (Mouchet *et al.*, 1960). Avant l'utilisation des insecticides, les principales mesures de lutte étaient basées sur la destruction des gîtes et l'assainissement urbain. Or, les résultats spectaculaires obtenus avec les premiers traitements insecticides ont entraîné le relâchement puis l'abandon des mesures d'hygiène publique, augmentant par là même le nombre de gîtes favorables à son développement. Enfin, l'utilisation généralisée des lessives et savons industriels par les habitants aurait modifié les paramètres physico-chimiques des gîtes larvaires en faveur de *C. p. quinquefasciatus* et au détriment d'autres espèces comme *C. cinereus* (Subra, 1973).

2.1.3. Résistance de *C. p. quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest

En Afrique de l'Ouest, la notification des premiers cas de résistance au DDT et à la dieldrine remonte à 1958. Observée d'abord en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso (Adam *et al.*, 1958; Hamon *et al.*, 1958), puis au Mali (Hamon *et al.*, 1961), la résistance aux organochlorés s'est ensuite rapidement étendue au cours des dix années qui ont suivi. En 1968, une enquête réalisée dans 7 pays d'Afrique de l'Ouest a montré que toutes les populations testées étaient résistantes à la dieldrine et la plupart au DDT. Elles étaient en revanche sensibles aux organophosphorés qui ont alors rapidement remplacé les organochlorés (Mouchet *et al.*, 1968).

La résistance aux organophosphorés fut au départ restreinte à quelques foyers. La résistance au malathion et au diazinon a été décrite dès 1963 à Freetown (Sierra Leone), mais les populations redevinrent naturellement sensibles 3 mois après l'arrêt des traitements (Hamon et Mouchet, 1967). Lors d'une étude portant sur 6 populations d'Afrique de l'Ouest, une résistance au diazinon a été observée au Bénin mais pas aux autres organophosphorés (Subra *et al.*, 1968). Il existe peu de données sur l'évolution de la résistance dans cette région au cours des années 70, mais dans les autres parties du monde, la résistance aux organophosphorés s'est rapidement étendue (Brown, 1986).

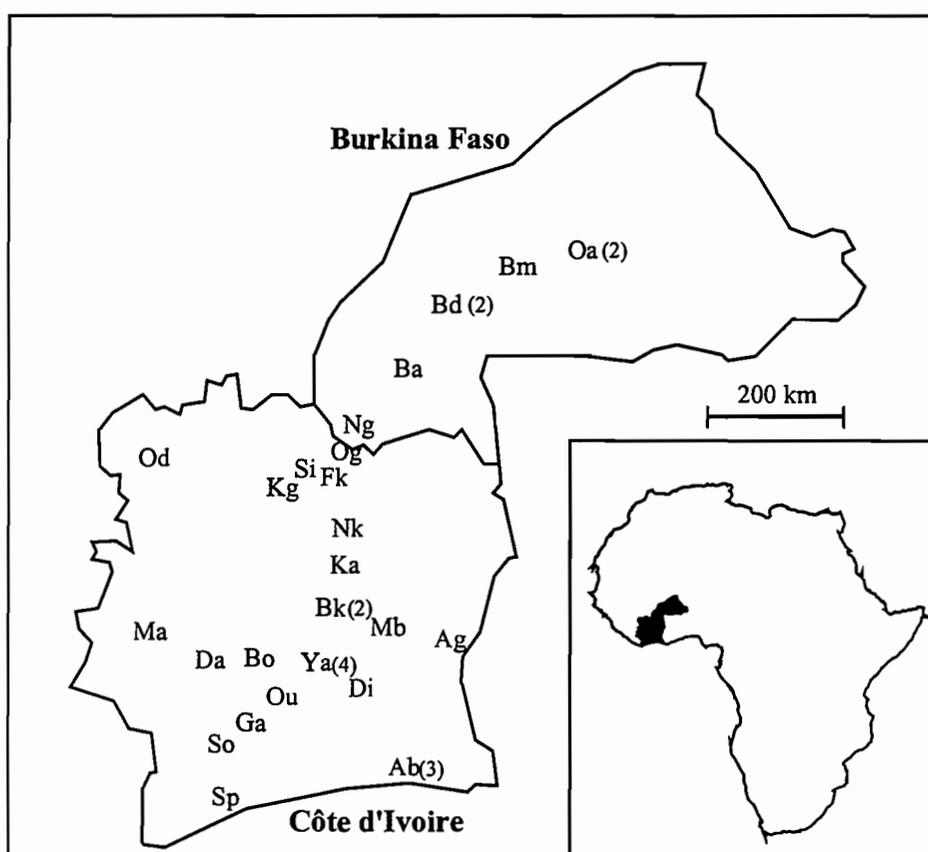
Dans les années 80, une faible résistance au chlorpyrifos et au téméphos associée à la présence des estérases surproduites A2-B2 a été observée au Liberia, en Côte d'Ivoire, au Burkina Faso ainsi qu'en Afrique de L'Est (Tanzanie) (Curtis et Pasteur, 1981; Villani *et al.*, 1983; Magnin *et al.*, 1988; Majori *et al.*, 1986).

2.2. Présentation de l'étude

La résistance de *C. p. quinquefasciatus* a été étudiée à partir d'un large échantillonnage (25 villes) réparties sur l'ensemble de la Côte d'Ivoire et du Burkina Faso (Figure 2.1). Les prélèvements ont été réalisés selon plusieurs transects, le plus long allant d'Abidjan à Ouagadougou. Afin d'étudier la variabilité d'un quartier à l'autre d'une même ville, plusieurs échantillons ont été collectés dans les agglomérations les plus importantes (Abidjan, Yamoussoukro, Bouaké, Bobo-Dioulasso et Ouagadougou).

Figure 2.1. Carte des villes échantillonnées pour l'étude de la résistance de *C. p. quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest.

Nombre de quartiers analysés entre parenthèses. **Côte d'Ivoire:** Ab, Abidjan; Ag, Abengourou; Bk, Bouaké; Bo, Bouaflé; Da, Daloa; Di, Dimbokro; Fk, Ferkessédougou; Ga, Gagnoa; Ka, Katiola; Kg, Korhogo; Ma, Man; Mb, M'bahiakro; Nk, Niakaramandougou; Od, Odienné; Og, Ouangolo; Ou, Ourné; Si, Sinématiali; So, Soubré; Sp, San Pédro; Ya, Yamoussoukro; **Burkina Faso:** Ba, Banfora; Bd, Bobo-Dioulasso; Bm, Boromo; Ng, Niangoloko; Oa, Ouagadougou.



Les niveaux de résistance ont été déterminés au stade larvaire vis à vis d'un ou deux insecticides des principales familles: chlorpyrifos éthyl et téméphos pour les organophosphorés, propoxur et carbosulfan pour les carbamates, perméthrine et deltaméthrine pour les pyréthrinoides.

Une étude détaillée des mécanismes de résistance a été entreprise à partir de souches issues de populations résistantes du terrain, ultérieurement sélectionnées au laboratoire pendant plusieurs générations. Les sélections ont été faites en exposant les larves à des concentrations croissantes d'insecticide entraînant de 60 à 90% de mortalité. Trois souches sélectionnées avec trois insecticides différents ont ainsi été obtenues: Kop

(chlorpyrifos), Super-Car (propoxur) et Bk-Per (perméthrine). Les mécanismes de résistance ont été caractérisés en utilisant:

- des essais biologiques en présence ou non de synergistes,
- des électrophorèses pour la mise en évidence des allèles d'estérases surproduites,
- la quantification par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie de l'activité des enzymes impliquées dans la résistance (estérases, oxydases),
- des mesures d'activité de l'acétylcholinestérase en présence d'insecticides inhibiteurs.

Les résultats de ces tests ont tous été comparés à ceux obtenus en parallèle avec une souche sensible de référence, S-Lab (Georghiou *et al.*, 1966).

2.3. Distribution de la résistance aux organophosphorés et aux carbamates

Article 2 - Chandre F., Darriet F., Doannio J.M.C, Rivière F., Pasteur N., Guillet P. 1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *Journal of Medical Entomology*. 34: 664-671.

La résistance aux organophosphorés et aux carbamates présente de fortes disparités entre les deux pays indiquant que *C. p. quinquefasciatus* subit une plus forte pression de sélection en Côte d'Ivoire qu'au Burkina Faso. En Côte d'Ivoire, les niveaux de résistance à la CL_{95}^1 (RR_{95}^2) varient de 4 à 30 fois avec le chlorpyrifos et de 3 à 18 fois avec le téméphos. Au Burkina Faso, les RR_{95} vont de 3 à 6 fois pour le chlorpyrifos et de 1 à 2 pour le téméphos. Cette résistance est associée dans les deux cas à la présence de plusieurs allèles d'estérases surproduites mis en évidence par électrophorèse (Tab. 2.1).

¹ CL_{95} Concentration létale 95, concentration d'insecticide qui tue 95% des individus

² RR_{95} "Resistance Ratio 95", rapport de la CL_{95} de la souche étudiée sur la CL_{95} de la souche sensible de référence

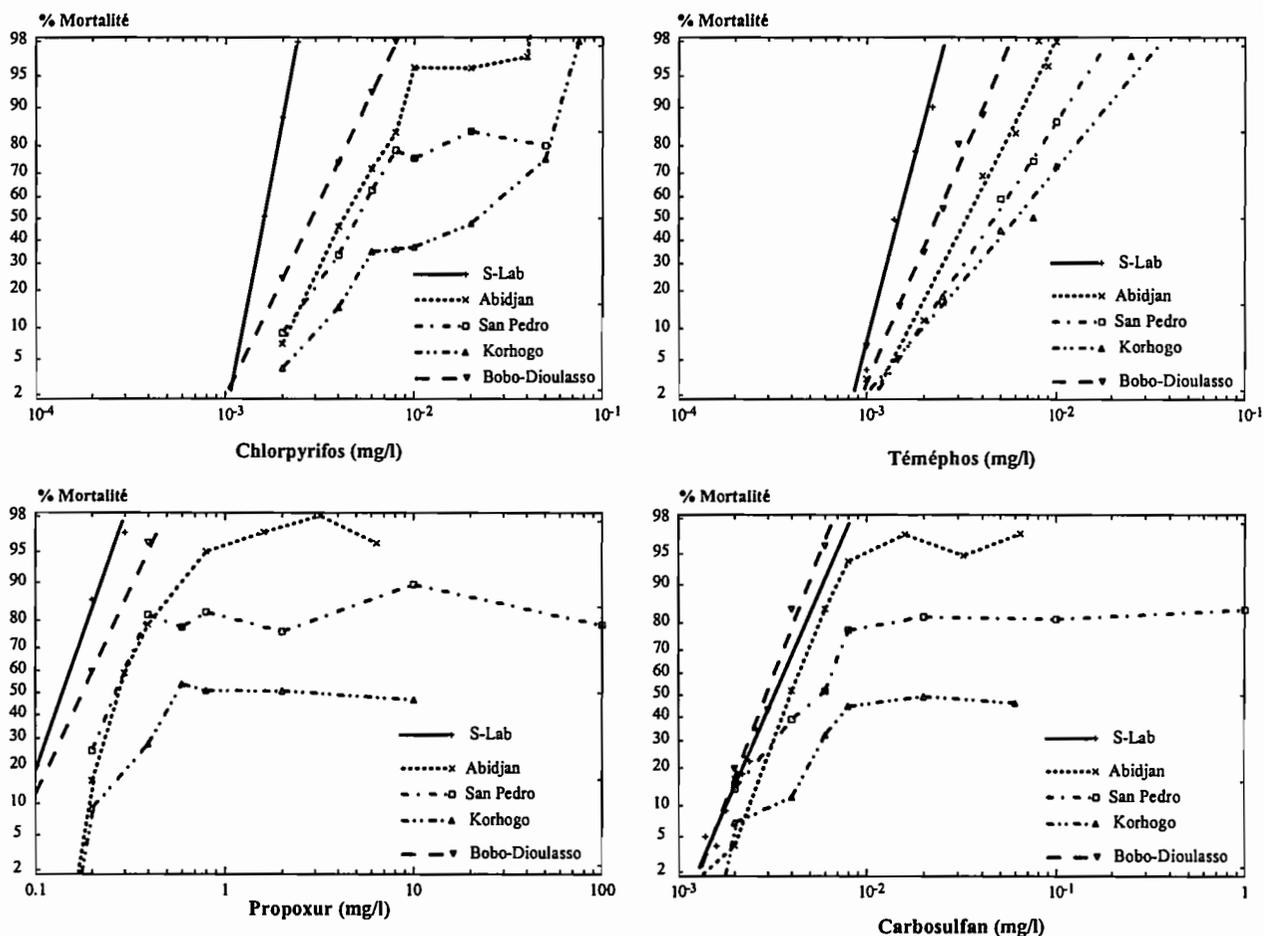
Tableau 2.1. Fréquence (en %) des mécanismes de résistance aux organophosphorés et au carbamates dans différentes populations de *C. p. quinquefasciatus* de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso.

Villes	Estérases surproduites			AChE1 insensible		
	A2-B2	"B1"	"C2"	<i>Ace. I^{SS}</i>	<i>Ace. I^{RS}</i>	<i>Ace. I^{RR}</i>
Côte d'Ivoire						
Korhogo	81.3	0	54.2	42.1	49.1	8.8
Bouaflé	74.5	0	8.5	50.0	41.4	8.6
Daloa	83.0	0	46.8	60.7	33.9	5.4
Ouangolo	95.8	10.4	37.5	56.3	35.4	8.3
San Pédro	73.3	0	55.6	82.2	17.8	0
Man	95.8	6.3	41.7	78.7	19.1	2.1
Bouaké	100	0	41.7	87.5	12.5	0
Abidjan	93.7	10.6	37.7	93.1	3.4	3.4
Katiola	83.9	0	11.8	96.6	3.4	0
Burkina Faso						
Ouagadougou	39.6	0	12.5	100	0	0
Bobo Dioulasso	55.3	0	25.5	100	0	0

Les fréquences des estérases A2-B2 en Côte d'Ivoire (73-100%) sont supérieures à celles observées au Burkina Faso (40-55%), et traduisent sans aucun doute une différence de pression sélective dans les deux pays. A partir d'études précédentes (Magnin *et al.*, 1988; Majori *et al.*, 1986), on observe que cette fréquence a par ailleurs augmenté plus fortement à Bouaké, passant de 60% en 1986 à 100% dans notre étude, qu'à Ouagadougou, où elle est passée de 30 à 40% durant la même période. Deux autres estérases surproduites ont été identifiées pour la première fois en Afrique de l'Ouest. L'une d'elles possède le même profil électrophorétique que l'estérase C2 de Puerto Rico et l'autre le même que celui de B1 de Californie. L'allèle C2 est présent dans les deux pays avec une fréquence de 8 à 55% tandis que l'allèle B1 n'a été observé qu'en Côte d'Ivoire. Leur rôle dans la résistance est documenté au paragraphe 2.4.

La présence d'un allèle acétylcholinestérase insensible¹ (*Ace.1^R*) a également été détectée dans la majorité des populations de Côte d'Ivoire (Tab. 2.1). AChE1 étant la cible des organophosphorés et des carbamates, *Ace.1^R* confère une résistance croisée à la plupart des insecticides de ces deux familles. Sa présence se traduit par un plateau de mortalité lorsqu'on étudie la relation entre la concentration (en log) et la mortalité (en probit) (Fig. 2.2).

Figure 2.2. Relation entre la concentration d'insecticide et la mortalité pour la souche sensible (S-Lab), trois populations de Côte d'Ivoire (Abidjan, San Pedro, Korhogo) et une population du Burkina Faso (Bobo-Dioulasso): présence d'un plateau de mortalité avec le chlorpyrifos, le propoxur et le carbosulfan pour les échantillons de Côte d'Ivoire.

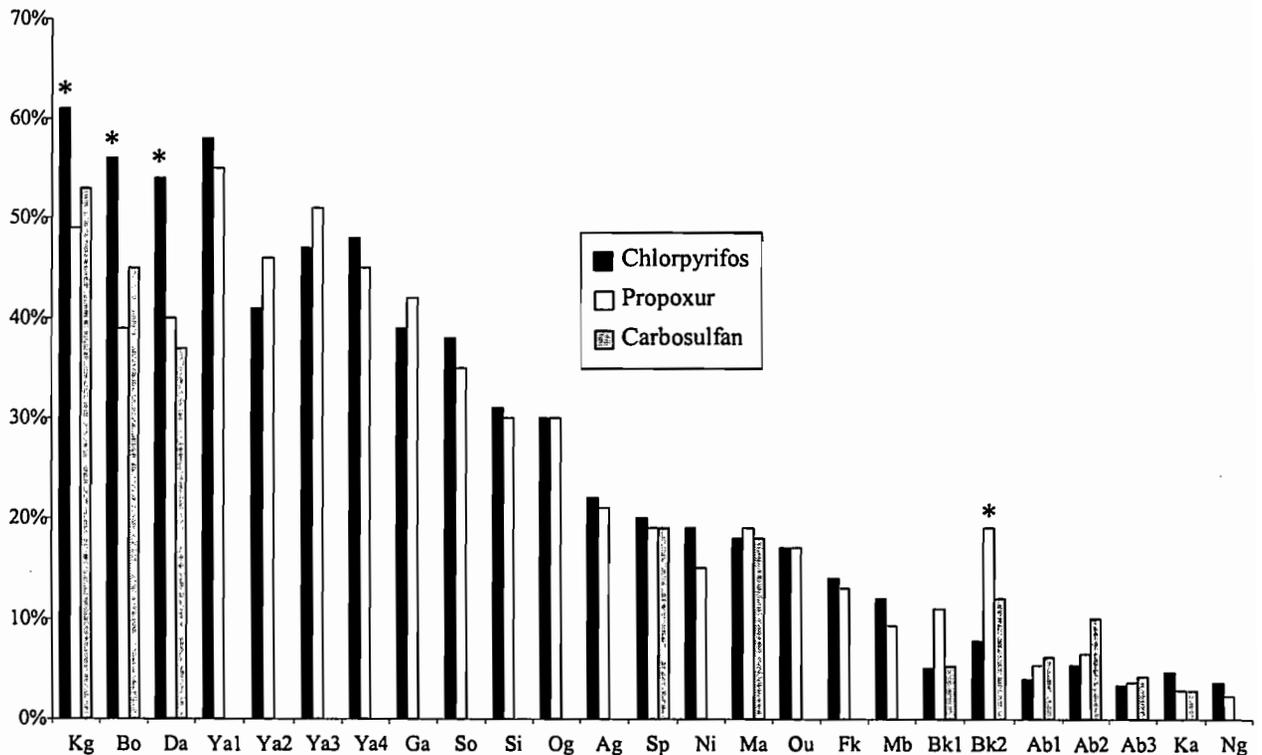


¹ Chez *C. pipiens s.l.*, il existe deux acétylcholinestérases AChE1 et AChE2 codées par deux gènes *Ace.1* et *Ace.2* (Bourguet *et al.*, 1996b). Seul AChE1 joue un rôle physiologique au niveau des synapses cholinergiques, celui de AChE2 étant inconnu. *Ace.1^R* désigne un allèle mutant codant pour une AChE1 insensible.

L'existence d'un plateau de mortalité indique que chaque échantillon est composé de deux types d'individus qui ne présentent pas la même réponse à l'insecticide. Une partie des larves est tuée aux basses concentrations correspondant à la partie de la courbe avant le plateau. L'autre partie des individus, possédant un phénotype "résistant", commence à mourir à des concentrations plus fortes correspondant à la courbe située après le plateau. Le taux de mortalité au plateau permet d'estimer la proportion de chacun des phénotypes. Pour démontrer que *Ace.1^R* est bien le principal mécanisme responsable de la résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates, nous avons comparé les fréquences des phénotypes "résistants" pour le chlorpyrifos, le propoxur et le carbosulfan (Fig. 2.3).

Figure 2.3. Pourcentages des phénotypes "résistants" estimés à partir des plateaux de mortalité avec le chlorpyrifos, le propoxur et le carbosulfan: mise en évidence d'un mécanisme de résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates.

*, Différence significative entre les 3 insecticides.



Les résultats montrent que dans la plupart des échantillons, la fréquence des individus "résistants" ne diffère pas significativement d'un insecticide à l'autre, et que c'est donc le même mécanisme qui est impliqué dans la résistance à ces trois

insecticides. Par ailleurs, cette fréquence ne diffère pas non plus du pourcentage d'homozygotes résistants (*Ace.I^{RR}*) et d'hétérozygotes (*Ace.I^{RS}*) ce qui confirme également que *Ace.I^R* est le mécanisme majeur de résistance croisée à ces trois insecticides.

La linéarité des courbes log-probit obtenues avec un autre organophosphoré, le téméphos (Fig. 2.2) indique qu'*Ace.I^R* ne confère qu'une faible résistance à cet insecticide. Le même cas de figure est également observé avec l'allèle *Ace.I^R* présent chez *C. p. pipiens* en France qui procure une résistance de l'ordre de 100 fois au chlorpyrifos mais de 10 fois seulement au téméphos (Raymond *et al.*, 1986).

A l'exception de Niangoloko, ville située immédiatement à la frontière avec la Côte d'Ivoire, l'allèle *Ace.I^R* est pour le moment absent du Burkina Faso.

Les mutations aboutissant à un nouveau mécanisme de résistance sont des événements rares. Dans le complexe *C. pipiens*, seuls huit allèles d'estérases surproduites aux locus A et B ont été décrits jusqu'à présent¹, certains comme A2-B2 et B1 étant largement représentés sur plusieurs continents (Raymond et Pasteur, 1996). L'absence de variabilité des cartes de restriction ou des séquences d'ADN codant pour ces allèles chez des individus provenant de pays différents, indique que ces estérases sont probablement issues d'événements mutationnels uniques et se sont dispersées ensuite dans les populations du complexe *C. pipiens* (Raymond *et al.*, 1991; Qiao et Raymond, 1995; Guillemaud *et al.*, 1996). La répartition d'A2-B2 et de C2 dans l'ensemble de notre zone d'étude témoigne que des échanges génétiques existent ou ont existé entre les populations de *C. p. quinquefasciatus* d'Afrique de l'Ouest. De la même façon, il est probable que la présence de *Ace.I^R* sur toute la Côte d'Ivoire soit le résultat de la migration des moustiques porteurs de cet allèle plutôt que de l'apparition simultanée de plusieurs mutations dans les différentes localités. Les variations de fréquence de *Ace.I^R* d'une ville à l'autre peuvent résulter d'une variation des pressions sélectives exercées sur ce moustique localement mais également du temps qui s'est écoulé depuis que *Ace.I^R* a été introduit dans chacune des villes.

¹ Ces allèles sont A1, B1, B6, B7, B8 et les 3 estérases co-amplifiées A2-B2, A4-B4, A5-B5

L'absence de *Ace.1^R* au Burkina Faso peut être liée nous l'avons vu, à la plus faible pression sélective exercée dans ce pays. Toutefois, il est possible également que cet allèle apparu initialement en Côte d'Ivoire n'ait pas encore eu suffisamment de temps pour s'étendre, la frontière entre ces deux pays jouant pour le moment un rôle de barrière géographique. En Afrique, le réseau routier est généralement le principal moyen de transport des personnes et des marchandises. Il est intéressant de noter que la seule route entre ces deux pays passe par Niangoloko, seule localité du Burkina Faso où nous avons détecté la présence de *Ace.1^R*. La plupart des véhicules provenant de Côte d'Ivoire sont immobilisés pendant plusieurs heures, parfois plusieurs jours au poste de douane situé à quelques centaines de mètres au sud de cette ville. Il est probable que la majorité des moustiques transportés passivement dans les véhicules en sortent pour rechercher un lieu de ponte dans la ville ou meurent à l'intérieur des habitacles du fait de leur exposition prolongée au soleil. La disparition du moustique à l'intérieur des véhicules au départ de Niangoloko est sans doute le facteur déterminant qui retarde l'extension d'*Ace.1^R* au Burkina Faso.

Chez *C. pipiens*, les allèles *Ace.1^R* apparaissent généralement après plusieurs années de lutte avec des organophosphorés et dans des populations qui possèdent déjà des estérases surproduites. Ce fut le cas par exemple, en France (Raymond *et al.*, 1985) en Italie (Villani et Hemingway, 1987; Severini *et al.*, 1993) et à Cuba (Bisset *et al.*, 1990). Cependant, en Tanzanie, *Ace.1^R* a été détecté dans une zone où les populations ne faisaient pas l'objet d'opérations de lutte (Khayrandish et Wood, 1993). En Côte d'Ivoire, seuls des traitements sporadiques organisés ont été effectués contre *C. p. quinquefasciatus* au cours des 20 dernières années. La résistance actuellement observée semble résulter donc avant tout de la pression de sélection engendrée par l'usage domestique des insecticides.

Au sein d'une même ville, les niveaux de résistance sont similaires d'un quartier à l'autre. Ils résultent peut être en partie d'une pression de sélection relativement homogène à l'échelle de la ville, mais surtout du fort brassage génétique qui existe entre les populations de moustiques de différents quartiers (chapitre 3).

2.4. Interactions des différents mécanismes de résistance aux organophosphorés et aux carbamates

Article 3 - Chandre F., Bourguet D., Pasteur N., Guillet P. Interaction of multiple organophosphate and carbamate resistance genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* from West Africa. (en préparation).

La contribution des différents mécanismes à la résistance aux organophosphorés et aux carbamates a été étudiée à partir de deux souches, l'une provenant d'Abidjan et sélectionnée au chlorpyrifos (Kop), et l'autre de Bouaké, sélectionnée au propoxur (Super-Car).

Au départ, les deux souches ne présentaient pas le même équipement enzymatique, Kop ayant l'estérase B1 en plus des estérases A2-B2, C2 et de *Ace.1^R*. Toutefois, leurs niveaux d'activité estérasique étaient identiques (ANOVA, $F = 7.10^{-5}$, $P = 0.99$) et correspondaient à 11 fois celui de la souche sensible S-Lab. Après 21 générations de sélection, la résistance de ces deux souches s'étend à une large gamme d'organophosphorés ainsi qu'au propoxur (Tab. 2.2).

Tableau 2.2. Concentrations létales (en mg/l) et niveaux de résistance des souches résistantes Kop et Super-Car vis à vis de 6 organophosphorés et du propoxur après 21 générations de sélection (S-Lab; souche sensible)

Insecticide	Souche	CL ₅₀	CL ₉₅	RR ₅₀	RR ₉₅
Chlorpyrifos	S-Lab	0.0016	0.0022	--	--
	Super-Car	0.0421	0.1183	26.3	53.8
	Kop	0.5072	0.8682	317.0	394.6
Téméphos	S-Lab	0.0015	0.0023	--	--
	Super-Car	0.0102	0.0274	6.8	11.9
	Kop	0.0355	0.0475	23.7	20.7
Fenitrothion	S-Lab	0.0046	0.0088	--	--
	Super-Car	0.4814	0.9666	104.7	109.8
	Kop	1.3513	2.0182	293.8	229.3
Pyraclofos	S-Lab	0.0242	0.0454	--	--
	Super-Car	0.2767	0.5461	11.4	12.0
	Kop	0.3142	0.5143	13.0	11.3
Chlorphoxim	S-Lab	0.0079	0.0139	--	--
	Super-Car	0.1471	0.4594	18.6	33.1
	Kop	0.3800	0.6439	48.1	46.3
Pirimiphos méthyl	S-Lab	0.0122	0.0267	--	--
	Super-Car	0.1842	0.4451	15.1	16.7
	Kop	0.2576	0.3921	21.1	14.7
Propoxur	S-Lab	0.1390	0.2550	--	--
	Super-Car	617.01	1147.55	4440	4500
	Kop	590.02	1064.72	4240	4175

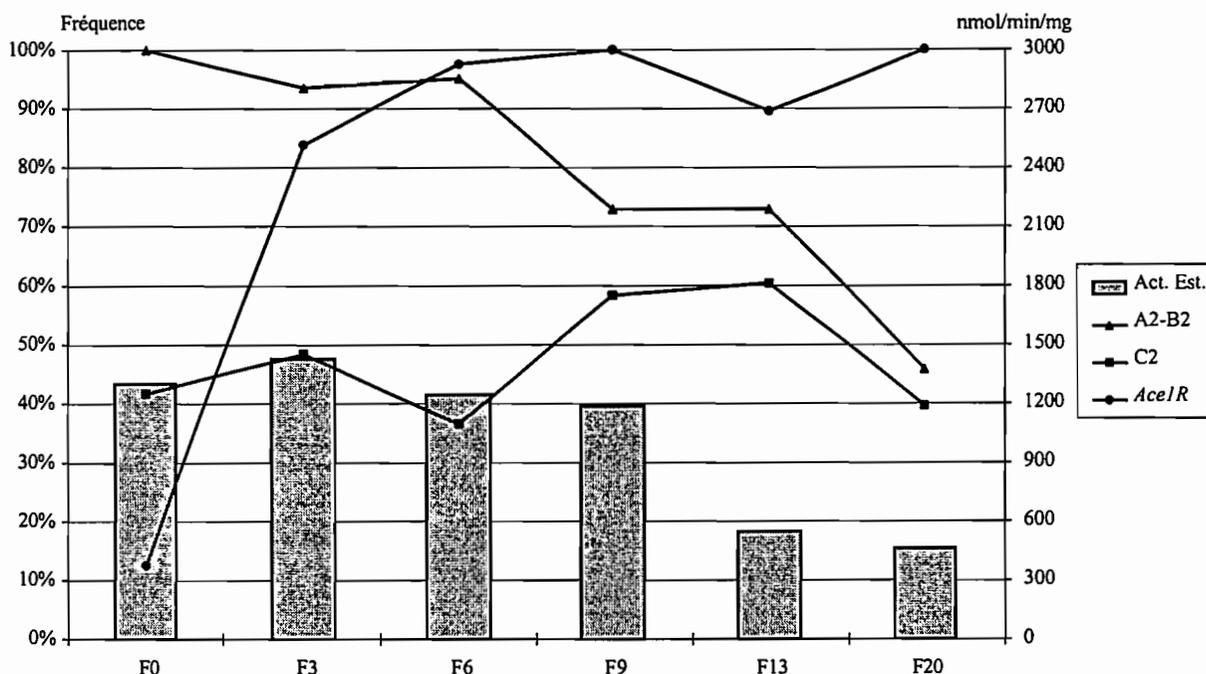
Alors que les deux souches possédaient initialement le même niveau de résistance au chlorpyrifos et au propoxur, Kop est devenue significativement plus résistante que Super-Car à certains organophosphorés, l'écart le plus important étant observé pour le chlorpyrifos. Toutefois, les deux souches ont le même niveau de résistance au pyraclofos, au pirimiphos méthyl et au propoxur. Plusieurs expériences ont été réalisées pour déterminer si ces différences étaient liées aux estérases (sélection de ou contre sélection de certains allèles) ou à la présence d'allèles *Ace.1^R* distincts.

Les essais biologiques réalisés avec les synergistes classiques ont montré que ni les oxydases ni les estérases ne contribuaient de façon significative à la résistance de la souche Kop au chlorpyrifos et à celle de Super-Car au propoxur. Si l'absence de mécanisme de détoxification est fréquente pour la résistance au propoxur, ce résultat est beaucoup plus inattendu pour la souche Kop compte tenu de la présence d'estérases surproduites dans la population initiale. Nous avons donc suivi l'évolution des

mécanismes de résistance sur plusieurs générations pour les deux souches (Fig 2.4 et 2.5).

Figure 2.4. Evolution des mécanismes de résistance au cours de la sélection au propoxur de la souche Super-Car.

Act. Est., Activité estérasique en nanomoles de α -Naphthol produit par minute et milligramme de protéine. A2-B2, C2 et *Ace.1^R* sont exprimées en pourcentages (homozygotes+hétérozygotes) Super-Car



Evolution des mécanismes de résistance de la souche Super-Car (Fig. 2.4).

Le propoxur sélectionne très rapidement l'acétylcholinestérase insensible *Ace.1^R*. Toutefois cet allèle étant complètement dominant pour la résistance aux carbamates, les concentrations utilisées pour la sélection larvaire ne permettent pas de discriminer les hétérozygotes des homozygotes résistants. Cela explique pourquoi, même après 20 générations, *Ace.1^R* n'est pas fixé et la fréquence des hétérozygotes relativement forte (18%).

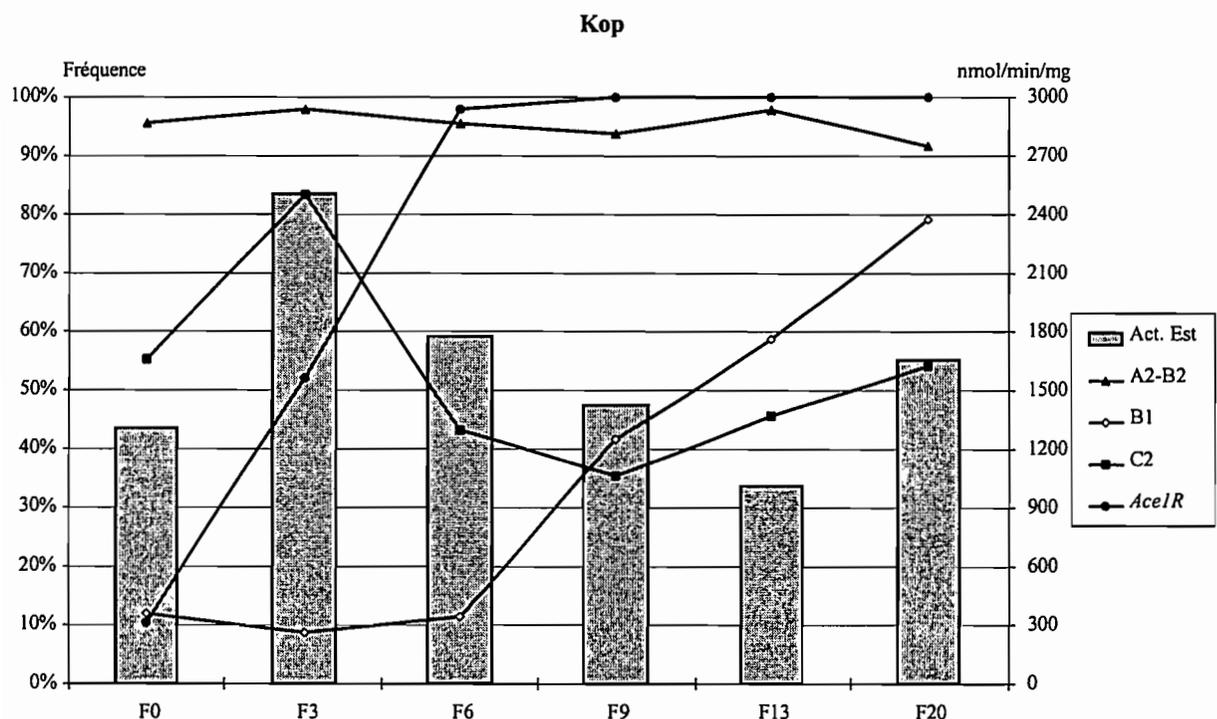
L'activité estérasique de Super-Car F20 est significativement plus faible qu'au départ ($F = 47.3$, $P < 0.0001$). Elle est associée à une diminution significative de la fréquence des estérases A2-B2. Il est probable que leur diminution soit due à un effet pléiotropique négatif, ou coût génétique de la résistance, qui leur est associé. L'existence d'un coût génétique associé à la présence de A2-B2 a déjà été mis en évidence au laboratoire (Raymond *et al.*, 1993) et il expliquerait que ces estérases régressent sur le

terrain après l'arrêt des traitements insecticides (Severini *et al.*, 1993). Il est intéressant de noter que la contre sélection de A2-B2 ne s'est opérée qu'à partir du moment où la quasi totalité des individus sont devenus résistants au propoxur (98% d'individus *Ace.1^{RR}* et *Ace.1^{RS}*). Ces estérases ne conférant pas de résistance au propoxur, elles ne confèrent pas d'avantage en présence de propoxur et sont donc progressivement éliminées.

En revanche, il n'existe probablement pas de coût important associé à C2, sa fréquence ne variant pas entre le début et la fin de la sélection.

Figure 2.5. Evolution des mécanismes de résistance au cours de la sélection au chlorpyrifos de la souche Kop.

Est. Act., Activité estérasiqne en nanomoles de α -Naphthol produit par minute et milligramme de protéine. A2-B2, C2 et *Ace.1^R* sont exprimées en pourcentages (homozygotes+hétérozygotes)



Evolution des mécanismes de résistance de la souche Kop (Fig. 2.5).

Comme dans le cas précédent, le chlorpyrifos entraîne une augmentation rapide de *Ace.1^R*. En revanche, la fixation de cet allèle (100% *Ace.1^{RR}*) obtenue à partir de la F13 indique que la dominance au chlorpyrifos n'est que partielle, les individus *Ace.1^{RR}* étant préférentiellement sélectionnés par rapport aux hétérozygotes *Ace.1^{RS}*.

Bien qu'initialement A2-B2 soit présent chez 96% des moustiques et que ces estérases confèrent une résistance au chlorpyrifos (Wirth *et al.*, 1990), leur fréquence demeure inchangée après 20 générations de sélection. Ceci est également le cas pour l'estérase C2. La fréquence de B1, stable en début de sélection jusqu'à la F6, augmente ensuite progressivement suggérant qu'un avantage sélectif lui est associé en présence de chlorpyrifos. Pour expliquer ce résultat, il faut considérer que l'estérase B1 ne contribue probablement pas significativement à la résistance en comparaison de *Ace.1^R* et par conséquent elle n'est pas sélectionnée lors des premières générations. Ensuite, lorsque la majorité des individus sont homozygotes *Ace.1^{RR}* (98% à la F6), alors l'avantage procuré par B1 même faible, suffit à induire sa sélection.

La faible contribution des estérases à la résistance chez Kop est également confirmée par le fait que l'activité estérasique n'a pas varié significativement après 20 générations de sélection ($F = 2.92$, $P = 0.09$). Paradoxalement, l'augmentation de la fréquence de B1 tandis que celles de A2-B2 et de C2 sont restées stables, aurait dû s'accompagner d'une augmentation de l'activité estérasique globale de ces moustiques. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat, soit:

- que B1 ne contribue pas significativement à l'activité estérasique par rapport à A2-B2 et C2
- ou que les activités d'A2-B2 et de C2 aient été parallèlement diminuées sans que leur fréquence n'ait changé, par exemple, par contre sélection des individus ayant les plus forts niveaux d'amplification pour A2-B2 et C2.
- ou que B2 et B1 sont alléliques¹.

Une sélection contre des estérases de forte activité, en présence d'un allèle *Ace.1^R*, a déjà été observée avec le malathion chez une souche de *C. p. quinquefasciatus* (Bonning et Hemingway, 1991). Ces auteurs ont montré que la sélection au malathion induit une diminution de l'activité estérasique tant que la fréquence de *Ace.1^R* augmente. L'activité estérasique augmente ensuite quelques générations après que l'allèle *Ace.1^R* ait

¹ Une étude est actuellement en cours pour déterminer si B1 en Côte d'Ivoire correspond à l'allèle B1 décrit en Californie et en Chine ou bien s'il s'agit d'un nouvel allèle.

été fixé. Il est possible que la sélection de la souche Kop n'ait pas été maintenue suffisamment longtemps pour constater un tel accroissement de l'activité estérasique après la fixation de *Ace.1^R*.

Les estérases ne permettant pas d'expliquer la plus forte résistance aux organophosphorés de Kop par rapport à Super-Car, les propriétés catalytiques de l'AChE1 de ces deux souches ont été comparées entre elles ainsi qu'à celles de S-Lab (Tab. 2.3 et 2.4).

Tableau 2.3. Constantes d'inhibition (k_i) de l'AChE1 de la souche sensible (S-Lab) et des souches résistantes (Kop, Super-Car)

Souches	k_i ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$)				
	Propoxur	Eserine	Malaoxon	Paraoxon	Aldicarb
S-Lab	145 000.00	15 000 000	1 200	160 000	6 400
Kop	0.54	53 000	180	240	540
Super-Car	0.55	57 000	180	230	540

Tableau 2.4. Rapports de dégradation de différents substrats des AChE1 des deux souches résistantes (Kop, Super-Car) et de la souche sensible (S-Lab).
(A: acétylthiocholine; B: butyrylthiocholine; P: propionylthiocholine)

Souches	P / A	B / A
S-Lab	0.747 ± 0.008	0.149 ± 0.007
Kop	0.250 ± 0.008	0.099 ± 0.006
Super-Car	0.247 ± 0.005	0.096 ± 0.004

Les constantes d'inhibition de l'AChE1 sont identiques chez les deux souches résistantes et très inférieures à celles de S-Lab, indiquant qu'elles sont quasiment insensibles à l'effet inhibiteur des insecticides testés (Tab. 2.3). Leurs capacités à dégrader d'autres substrats sont également altérées et de façon similaire (Tab. 2.4). Les propriétés catalytiques de Kop et Super-Car étant identiques, ces deux souches

possèdent donc sans doute le même allèle *Ace.1^R*. En effet, dans ce cas, comme dans d'autres cas de modification de la cible, il est probable que seul un nombre très limité de mutations pouvant induire une résistance soient compatibles avec la survie de l'insecte. Chez *Drosophila melanogaster* où 5 mutations différentes sont connues sur l'AChE, il a été montré que chaque modification d'un acide aminé ou chaque combinaison de plusieurs modifications impliquées dans la résistance se traduisait par de fortes différences de propriétés catalytiques (Mutero *et al.*, 1994). Sur la base de ses propriétés catalytiques, l'allèle *Ace.1^R* de Côte d'Ivoire semble être identique à celui présent dans les populations de *C. p. quinquefasciatus* de la Martinique, et de Cuba (Bourguet *et al.*, 1996a) ainsi que de certaines populations de *C. p. pipiens* du pourtour méditerranéen (Bourguet *et al.*, 1997b).

Les différences de résistance entre Kop et Super-Car n'étant dues ni à un mécanisme métabolique ni à l'allèle *Ace.1^R*, l'une des hypothèses alternatives serait que le chlorpyrifos ait sélectionné un mécanisme spécifique comme une réduction de pénétration de l'insecticide. De tels mécanismes sont rares et peu documentés chez *C. p. quinquefasciatus*, mais ils ont déjà été observés ou suspectés dans la résistance au chlorpyrifos de souches de laboratoire (Raymond *et al.*, 1989; Khayrandish et Wood, 1993). Ces mécanismes induisent généralement des faibles résistances mais ils interagissent de façon multiplicative avec les autres mécanismes (modification de cible, détoxification) pouvant conduire à une augmentation significative du niveau de résistance (Raymond *et al.*, 1989). Il est toutefois intéressant de noter que quel que soit le mécanisme impliqué, il accroît plus spécifiquement la résistance à l'insecticide utilisé pour sa sélection (chlorpyrifos) et que les écarts entre les niveaux de résistance de Kop et Super-Car aux autres organophosphorés sont nuls ou de l'ordre de deux fois seulement.

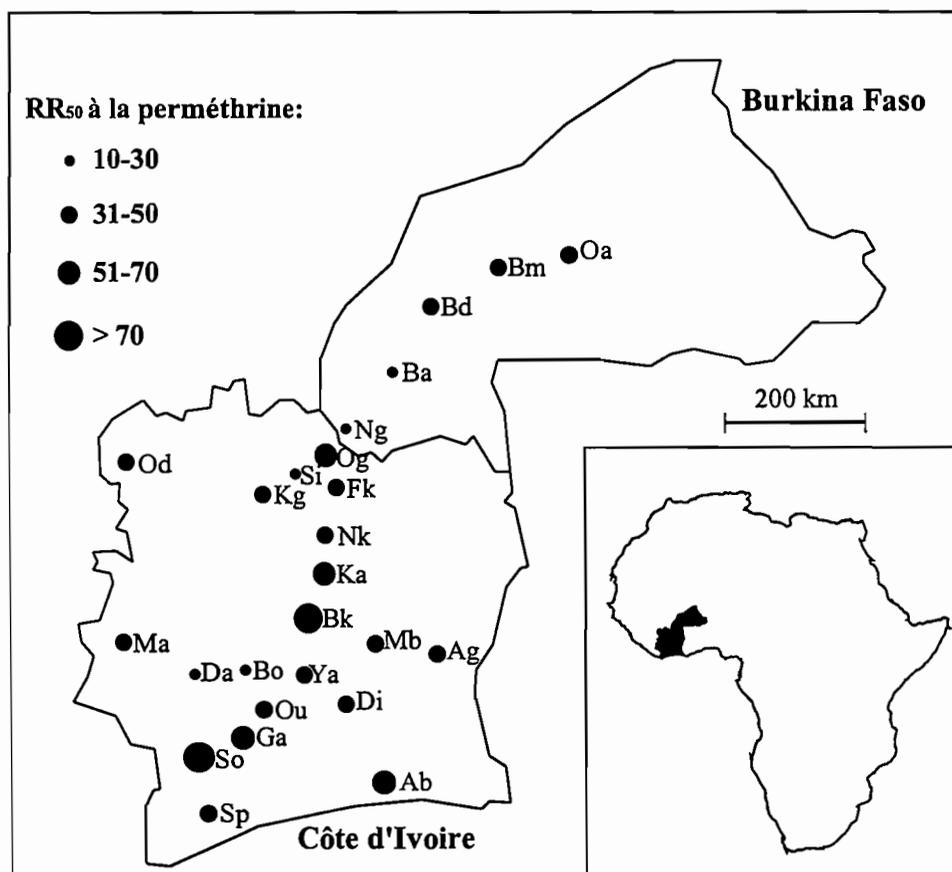
2.5. Résistance aux pyréthrinoides

Article 4 - Chandre F., Darriet F., Darder M., Cuany A., Doannio J.M.C., Pasteur N., Guillet P. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* from West Africa. *Medical & Veterinary Entomology*. 12: 359-366.

La résistance aux pyréthrinoides est beaucoup plus homogène entre les deux pays que dans le cas des organophosphorés, même si globalement les populations de Côte d'Ivoire apparaissent légèrement plus résistantes que celles du Burkina Faso (Fig. 2.6).

Figure 2.6. Niveaux de résistance à la perméthrine des populations de *C. p. quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest.

Côte d'Ivoire: Ab, Abidjan; Ag, Abengourou; Bk, Bouaké; Bo, Bouaflé; Da, Daloa; Di, Dimbokro; Fk, Ferkessedougou; Ga, Gagnoa; Ka, Katiola; Kg, Korhogo; Ma, Man; Mb, M'bahiakro; Nk, Niakaramandougou; Od, Odienné; Og, Ouangolo; Ou, Oumé; Si, Sinématiali; So, Soubré; Sp, San Pédro; Ya, Yamoussoukro; Burkina Faso: Ba, Banfora; Bd, Bobo-Dioulasso; Bm, Boromo; Ng, Niangoloko; Oa, Ouagadougou.



La plupart des RR_{50} varie de 30 à 70 pour la perméthrine et de 20 à 40 pour la deltaméthrine. Ils indiquent que toutes les populations sont sans aucun doute soumises à une forte pression de sélection. Comparé à une étude antérieure (Magnin *et al.*, 1988), le niveau de résistance à la deltaméthrine a été multiplié par un facteur deux à trois à Bouaké en moins de dix ans alors qu'aucun programme de lutte faisant appel aux pyréthrinoides n'a été pratiqué dans cette ville. Il n'existe apparemment pas de relation entre la résistance et des facteurs tels que la taille des agglomérations ou la proximité des zones de production agricole. En Afrique, les insecticides sont très largement utilisés par les habitants pour se protéger des nuisances en milieu urbain (Chambon *et al.*, 1997; Chavasse *et al.*, 1996). L'essentiel de cette consommation est constitué par les serpentins fumigènes et les aérosols qui contiennent principalement des pyréthrinoides. Les différences de niveaux de résistance d'une ville à l'autre résultent probablement de variations locales des pressions de sélection engendrées par l'usage domestique des insecticides. Comme pour les organophosphorés ces pressions varient probablement peu à l'échelle d'une même ville, compte tenu de la résistance similaire observée sur plusieurs quartiers, bien que ce résultat soit aussi à mettre en relation avec le fort brassage génétique entre quartiers (chapitre 3).

L'étude des mécanismes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoides a été effectuée à partir de la souche Bk-Per prélevée à Bouaké et sélectionnée avec la perméthrine. Après 42 générations de sélection son niveau de résistance à la perméthrine est passé de 66 à 3750 fois, mais est resté rigoureusement identique avec la deltaméthrine (34 fois). Deux mécanismes, au moins, interviennent dans cette résistance (Tab.2.5 et 2.6).

Tableau 2.5. Activités ECOD des adultes de la souche sensible (S-Lab) et de la souche résistante (Bk-Per)

Activité exprimée en picogrammes par minute et par milligramme de moustique \pm intervalle de confiance (95%). N, Nombre de moustiques.

Souche	Sexe	7-hydroxycoumarine produite	N
S-Lab	Femelle	37.2 \pm 6.5	31
	Mâle	15.9 \pm 2.8	52
Bk-Per	Femelle	59.9 \pm 12.9	29
	Mâle	40.3 \pm 6.4	55

Les bioessais réalisés avec les synergistes ainsi que la mesure de l'activité éthoxycoumarine dé-éthylase (Tab. 2.5) ont montré que la résistance était associée à une augmentation de l'activité enzymatique des mono-oxygénases à cytochrome P450. Toutefois, la synergie seulement partielle du PBO sur la résistance de Bk-Per et l'absence d'action du DEF, suggèrent l'intervention d'un autre mécanisme, non métabolique, probablement de type *kdr*. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons observé les moustiques lors de leur exposition à la perméthrine dans le test OMS (voir le paragraphe 4.3 pour le principe du test OMS).

Tableau 2.6. Temps de knockdown (KdT en minutes et intervalles de confiance à 95%) et mortalité à 24 h avec la perméthrine chez les adultes de la souche sensible (S-Lab) et de la souche résistante (Bk-Per).

Nd, non déterminable, moins de 5% de knockdown après 1 heure d'exposition

Souche	KdT ₅₀ (IC ₉₅)	KdT ₉₅ (IC ₉₅)	% Mortalité
Perméthrine 0.25%			
S-Lab	38.7 (35.7-41.8)	88.1 (77.1-105.3)	61
Bk-Per	Nd	Nd	3
Perméthrine 2.5%			
S-Lab	10.6 (9.8-10.7)	24.5 (23.1-26.3)	98
Bk-Per	108.7 (97.1-127.8)	287.2 (220.2-426.8)	13

En plus de la diminution de mortalité, les adultes de Bk-Per, présentent une forte résistance à l'effet knockdown des pyréthrinoides. A la dose de 0.25%, les individus résistants ne sont pas affectés par la perméthrine. A la dose de 2.5%, les temps de knockdown sont 10 fois supérieurs à ceux de S-Lab. Ces résultats suggèrent fortement la présence d'un allèle *kdr* dans la résistance aux pyréthrinoides de *C. p. quinquefasciatus*. L'analyse d'une partie de la séquence codant pour le canal Sodium voltage dépendant a montré que la même mutation responsable de la résistance aux pyréthrinoides chez *An. gambiae* (paragraphe 4.4) et plusieurs espèces d'insectes était également présente chez Bk-Per (Pauron, comm. pers.).

La sélection d'une souche avec un insecticide s'accompagne généralement d'une augmentation de la résistance aux autres molécules de la même famille. Ce fut le cas

notamment avec la perméthrine pour *C. p. quinquefasciatus* en Californie (Priester et Georghiou, 1980; Halliday et Georghiou, 1985). Or, de façon surprenante, le niveau de résistance de Bk-Per à la deltaméthrine est resté strictement identique après 42 générations de sélection avec la perméthrine. Une diminution de la sensibilité du système nerveux à la perméthrine mais pas à la cyperméthrine a été décrite chez *Spodoptera littoralis* (Gammon, 1980). Chez une souche de *C. p. quinquefasciatus* d'Arabie Saoudite résistante à la perméthrine et au DDT, des études électrophysiologiques ont montré que les cellules nerveuses étaient insensibles à certains pyréthrinoides et pas à d'autres (Amin et Hemingway, 1989; Hemingway, comm. pers.). Dans le cas de Bk-Per, bien que des mono-oxygénases soient impliquées dans la résistance à la perméthrine, une première analyse du métabolisme de la deltaméthrine radio-marquée a montré que cet insecticide n'était pas plus dégradé par les oxydases que dans une souche sensible (Cuany, comm. pers.). Il est donc possible d'envisager que la perméthrine ait pu favoriser la sélection d'oxydases spécifiques de son métabolisme.

2.6. Conclusion: résistance de *C. p. quinquefasciatus* aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles

La résistance des populations de *C. p. quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest s'étend à la fois aux organophosphorés, aux carbamates et aux pyréthrinoides. Elle est associée à la présence d'au moins quatre types de mécanismes différents:

- plusieurs estérases surproduites qui ne contribuent que faiblement à la résistance aux organophosphorés
- un allèle acétylcholinestérase insensible responsable d'une résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates
- une augmentation de l'activité des mono-oxygénases à cytochrome P450 qui interviennent dans la résistance aux pyréthrinoides
- une mutation de la cible des pyréthrinoides (gène *kdr*).

Malgré la présence de plusieurs mécanismes, la résistance aux organophosphorés n'est pas très élevée, probablement parce que la pression de sélection engendrée par l'usage domestique des insecticides est très limitée en l'absence de programme de lutte planifié contre *C. p. quinquefasciatus*. La présence de mécanismes différents dans les populations de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso a des implications directes sur les stratégies de lutte envisageables dans ces deux pays. En Côte d'Ivoire, l'utilisation des organophosphorés, même si ces produits peuvent avoir une certaine efficacité au départ, sera sans doute rapidement suivie d'une augmentation des niveaux de résistance compte tenu de la présence de *Ace.1^R* dans toutes les populations et à un moindre degré de celle des estérases. Toutefois, les mécanismes présents dans ces populations ne procurent pas le même degré de résistance à tous les organophosphorés. Pour deux souches soumises à une forte pression de sélection au laboratoire, la résistance observée n'a été que de 10 à 20 fois pour le téméphos, le pyraclofos et le pirimiphos méthyl. Il est possible que la résistance à d'autres organophosphorés soit encore plus faible. Ainsi, une stratégie de lutte basée sur une rotation entre un organophosphoré à faible résistance, et un insecticide biologique comme *Bacillus sphaericus*, permettrait sans doute de limiter la pression de sélection exercée sur les gènes de résistance aux organophosphorés. Au Burkina Faso, les organophosphorés conserveront vraisemblablement toute leur efficacité à court terme mais il existe toutefois un risque de voir apparaître l'allèle *Ace.1^R* par migration depuis la frontière avec la Côte d'Ivoire.

Bien que l'emploi des carbamates soit onéreux et qu'ils présentent une certaine toxicité sur les mammifères, ils ont été proposés pour imprégner des rideaux afin de lutter contre *C. p. quinquefasciatus* (Weerasooriya *et al.*, 1996; Curtis *et al.*, 1996). Ces insecticides risquent d'être complètement obsolètes en Côte d'Ivoire compte tenu de la très forte résistance engendrée par l'*Ace.1^R*.

L'analyse de deux souches au cours de leur sélection au laboratoire nous a montré que les interactions entre les différentes estérases et l'allèle *Ace.1^R* étaient relativement complexes et que leur sélection ou leur contre sélection s'opérait de façon séquentielle. Pour Super-Car, la sélection au propoxur (carbamate) augmente la

fréquence de l'allèle *Ace.1^R* et lorsque la quasi totalité des moustiques sont porteurs de cet allèle alors seulement, une contre sélection s'opère sur les estérases A2-B2. Pour Kop, l'utilisation du chlorpyrifos (organophosphoré) sélectionne au départ l'allèle *Ace.1^R* seul, puis lorsque celui-ci est quasiment fixé, il entraîne la sélection de l'estérase B1. Ces résultats témoignent des différences de fitness (avantage sélectif) associées à chacun de ces gènes en présence d'insecticide. Dans les populations naturelles de *C. p. pipiens* de telles différences de fitness permettent d'expliquer la distribution spatiale et temporelle des différents gènes de résistance dans les zones traitées et non traitées (Guillemaud *et al.*, 1998). Très récemment, l'influence de ces paramètres dans les populations naturelles a été soulignée dans le développement de nouvelles approches méthodologiques pour l'estimation des flux géniques et la modélisation de l'évolution de la résistance sur le terrain (Lenormand et Raymond, 1998; Lenormand *et al.*, 1998).

La résistance aux pyréthrinoides est plus préoccupante dans la mesure où seuls ces insecticides sont utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires destinées à lutter contre le paludisme. Cette résistance risque en effet de réduire l'impact que les moustiquaires auront sur la forte nuisance engendrée par *C. p. quinquefasciatus* en milieu urbain. Or le succès d'un programme de lutte nécessite avant tout une participation active des communautés (Mouchet et Guillet, 1985) et dans le cas des moustiquaires imprégnées l'un des facteurs essentiels qui motive leur utilisation est la réduction de la nuisance engendrée par les piqûres de moustiques, plus que la protection contre le paludisme lui-même. Si les moustiquaires imprégnées ne permettent pas une protection suffisamment forte contre *C. p. quinquefasciatus*, du fait de leur résistance, leur acceptation risque fort d'être compromise. Il semble donc inévitable pour les programmes antipaludiques en milieu urbain, de tenir compte de ce problème et, si nécessaire, d'envisager parallèlement à la mise en place des moustiquaires imprégnées, une lutte contre les larves de *C. p. quinquefasciatus*.

3. Structure des populations de *Culex pipiens quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest

3.1. Introduction

L'apparition d'un gène de résistance dans une population résulte soit de la sélection d'une mutation survenue spontanément, soit de la sélection d'un gène introduit par migration. Plusieurs exemples montrent que dans les populations naturelles de *C. p. pipiens* et *C. p. quinquefasciatus* la migration joue un rôle prépondérant par rapport à la mutation dans l'évolution de la résistance (Raymond *et al.*, 1991; Chevillon *et al.*, 1995; Pasteur *et al.*, 1995). Nous avons vu au chapitre précédent que certains mécanismes de résistance étaient largement répandus en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso. Une analyse de la structure des populations de *C. p. quinquefasciatus* a donc été entreprise dans le but d'estimer l'intensité des flux géniques et de préciser les modalités de circulation des gènes de résistance. Cette étude est basée sur le polymorphisme des gènes neutres, c'est à dire qui ne sont théoriquement pas soumis à une pression de sélection.

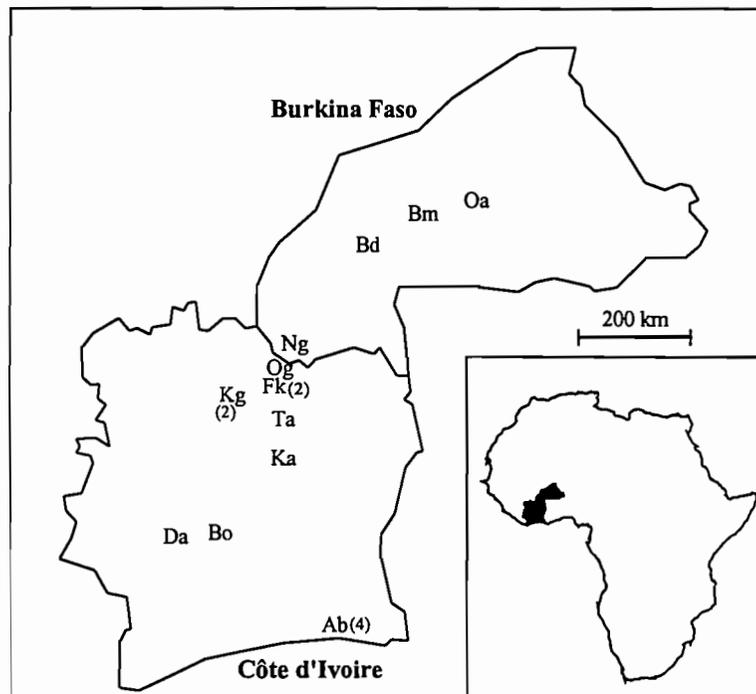
3.2. Matériel et Méthodes

3.2.1. Moustiques

Les analyses ont porté sur 13 échantillons de *C. p. quinquefasciatus* de Côte d'Ivoire et 4 du Burkina Faso (Fig. 3.1). La variabilité génétique à l'intérieur d'une même ville a été étudiée pour quatre quartiers d'Abidjan et deux quartiers de Ferkessédougou et Korhogo. Les moustiques ont été échantillonnés de la même façon que pour l'étude de la résistance. Les larves ont été élevées jusqu'à l'émergence puis les adultes ont été conservés dans l'azote liquide pour les électrophorèses.

Figure 3.1. Carte des villes échantillonnées pour l'étude de la structure des populations de *C. p. quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest.

Nombre de quartiers analysés entre parenthèses. Côte d'Ivoire: Ab, Abidjan; Bo, Bouaflé; Da, Daloa; Fk, Ferkessédougou; Ka, Katiola; Kg, Korhogo; Og, Ouangolo; Ta, Tafiré; Burkina Faso: Bd, Bobo-Dioulasso; Bm, Boromo; Ng, Niangoloko; Oa, Ouagadougou.



3.2.2. Electrophorèses

Les électrophorèses ont été faites sur gel d'acétate de cellulose. Nous avons adapté cette technique à *C. p. quinquefasciatus* à partir des méthodes utilisées pour les parasites sur acétate de cellulose (Abderrazak *et al.*, 1993) et pour les moustiques sur

gels d'amidon (Pasteur *et al.*, 1987). Afin d'augmenter le rendement de cette technique, nous avons mis au point une micro-méthode permettant l'analyse de 28 échantillons par gel, au lieu de 12 classiquement.

Des essais préliminaires ont été effectués sur des populations africaines de *C. p. quinquefasciatus* avec une quinzaine de systèmes enzymatiques. Seuls quatre locus se sont révélés suffisamment polymorphes pour permettre une interprétation des résultats, PGM (phosphoglucomutase), MPI (mannose phosphate isomérase), GOT1 et GOT2 (glutamate oxalo-acétate transaminases).

Les moustiques sont broyés sur de la glace dans 10 µl de tampon stabilisateur d'enzymes¹. Les gels d'acétate sont préalablement imbibés pendant 20-30 minutes dans une solution, correspondant au tampon de migration dilué. Les échantillons sont ensuite transférés sur le gel d'acétate à l'aide d'un micro applicateur. Après la migration, le gel d'acétate est placé sur un gel d'agar (1.2%) dans lequel sont incorporés les différents substrats, enzymes et colorants pour la révélation (Tab 3.1, 3.2).

Tableau 3.1. Tampons et conditions de migration électrophorétiques sur gels d'acétate de cellulose

Enzyme	Locus	Tampon Migration	Dilution Imbibition	Voltage	Durée
GOT (EC 2.6.1.1.) Glutamate oxalo-acétate transaminase	2	Tris 0.2M, Acide Maléique 0.2M, EDTA 0.02M, MgCl ₂ 0.02M, pH=7.4	1/24	200 V	25 mn
PGM (EC 2.7.5.1.) Phosphoglucomutase	1	Tris 0.1M, Acide Maléique 0.1M, EDTA 0.01M, MgCl ₂ 0.01M, pH=7.4	1/8	200 V	20 mn
MPI (EC 5.3.1.8.) Mannose phosphate isomérase	1	Tris 0.135M, Ac. citrique 0.043M, pH= 7.0	1/8	200 V	23 mn

Tableau 3.2. Recettes pour la révélation des différents systèmes enzymatiques

NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADP, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; NBT, nitro blue tetrazolium; PMS, phénazine méthosulfate; GDH, glutamate déshydrogénase; G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase; GPI, glucose-phosphate isomérase.

Enz.	Tampon	Substrat	Coenzyme/ Activateur	Colorant	Enzyme
GOT	Tris/HCl 0.1M pH=8, 10ml	Ac. cystine sulfonique 10mg Ac.α-kétoglutarique 10mg	NAD 10mg	NBT 5mg PMS 3mg	GDH 0.15UI
PGM	Tris/HCl 0.25M pH=8, 10ml	Glucose-1-phosphate 30mg	NADP 5mg MgCl ₂ 1M, 250µl	NBT 2.5mg PMS 3mg	G6PDH 6UI
MPI	Tris/HCl 0.1M pH=8, 10ml	Mannose 6-phosphate 10mg	NADP 5mg MgCl ₂ 1M, 250µl	NBT 2.5mg PMS 3mg	G6PDH 4UI GPI 8UI

¹ Tampon: Acide amino caproïque 2mM, EDTA 2mM, dithiothréitol 2 mM

3.2.3. Interprétation des résultats

Le principe de l'analyse est le suivant. Dans un premier temps on contrôle que les locus utilisés sont bien neutres en vérifiant qu'ils sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg et qu'il n'existe pas de déséquilibre de liaison. Ensuite on teste la différenciation entre les populations. Si cette différenciation est significative, on évalue le nombre de migrants efficaces échangés par les populations à chaque génération. Enfin, pour préciser de quelle manière sont structurées les populations il est possible de tester leur isolement en fonction de la distance (ou d'autres paramètres quantifiables) les séparant.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Genepop (version 3.1b) (dernière mise à jour du logiciel de Raymond et Rousset, 1995). L'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé à l'aide du test exact de Fisher (H_0 : union au hasard des gamètes) (Haldane, 1954). Bien que l'équilibre de Hardy-Weinberg à un locus puisse être vérifié, un déficit (ou plus rarement un excès) systématique d'hétérozygotes peut être observé témoignant par exemple que le locus en question n'est pas neutre, ou que les échantillons sont constitués d'un mélange de plusieurs sous-populations. Le déficit ou l'excès d'hétérozygotes a été estimé par l'indice F_{IS} de Wright qui correspond à l'écart à la panmixie des individus au sein de chaque population. Cet indice a été estimé par la méthode de Weir et Cockerham (1984) et testé par le test exact décrit dans Rousset et Raymond (1995).

Le déséquilibre de liaison est une association non aléatoire entre deux allèles appartenant à des locus différents. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'un déséquilibre de liaison dont la sélection naturelle s'exerçant sur certaines combinaisons alléliques et la dérive génétique. L'hypothèse nulle " H_0 : Le genotype à un locus est indépendant du genotype à un autre locus" a été testée pour chaque paire de locus et dans chaque population à l'aide du test exact de Fisher selon la méthode de Guo et Thompson (1992).

La différenciation des populations a été étudiée en testant les distributions des génotypes à chaque locus dans les différentes populations. L'hypothèse nulle testée est ici "H₀: la distribution des génotypes est identique entre les populations". Ce test est basé sur le test exact G de Goudet *et al.* (1996). Lorsque ce test est significatif à 5% on considère que l'indice F_{ST} (cf. § suivant) est significativement différent de zéro. Dans un premier temps, tous les échantillons ont été considérés de manière indépendante. Puis la structure des populations a été précisée en regroupant les échantillons à différentes échelles (quartiers, villes, pays).

La structuration des populations et les flux géniques ont été évalués à l'aide de l'indice F_{ST} de Wright. Wright a défini trois indices pour décrire l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg observé dans une population divisée en plusieurs sous-populations (In Hartl et Clarck, 1989). F_{IT} correspond à l'écart à la panmixie des individus par rapport à la population totale. F_{IS} correspond à l'écart à la panmixie des individus par rapport à la sous-population à laquelle ils appartiennent. F_{ST} correspond à l'écart à la panmixie dans les sous-populations par rapport à la population totale et représente la part de F_{IT}¹ qui est due à la subdivision. Plus simplement, F_{ST} représente la variance des fréquences alléliques entre les sous-populations par rapport à la variance globale des fréquences alléliques. Ces trois indices ont été estimés par la méthode de Weir et Cockerham (1984). Lorsque F_{ST} est significativement supérieur à zéro, il est relié au nombre de migrants efficaces (Nm) échangés entre les sous populations à chaque génération par l'équation²: $Nm = \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}}$.

Une seconde méthode, basée sur la distribution des allèles rares dans les échantillons, a été utilisée pour estimer les nombres de migrants efficaces (Slatkin, 1985).

¹ Ces trois indices sont reliés entre eux par l'équation: $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$. Lorsque les sous-populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg $F_{IS} = 0$ et $F_{IT} = F_{ST}$.

² Cette estimation de Nm suppose plusieurs hypothèses: que les gènes analysés soient neutres, que le taux de mutation soit négligeable face à la migration et que le modèle considéré soit un "modèle en île". C'est à dire qu'à chaque génération une fraction Nm de chaque sous-population contribue à la formation d'un pool de migrant qui est redistribué équitablement sur l'ensemble des sous-populations.

L'isolement des populations par la distance a été testé d'après la méthode de Rousset (1997). Ce programme calcule la régression de F_{ST} (ou $F_{ST}/(1-F_{ST})$) pour chaque couple de sous-populations en fonction de la distance qui les sépare. Le principal mode de migration de *C. p. quinquefasciatus* se faisant probablement de manière passive à l'intérieur des véhicules, les distances ont été calculées en fonction du principal axe routier séparant les villes deux à deux. La validité de la régression a été vérifiée par un test de Mantel.

Le niveau de significativité de chaque test est ensuite ajusté en tenant compte du nombre de test effectués simultanément selon la procédure séquentielle de Bonferonni (Rice, 1989).

3.3. Résultats

3.3.1. Description du polymorphisme enzymatique

3.3.1.1. Ecart à la panmixie

Quatre locus ont été analysés (Tab. 3.3): PGM (3 allèles), MPI (5 allèles), GOT1 (3 allèles) et GOT2 (2 allèles). Le locus GOT1 apparaît peu polymorphe puisque pour 16 populations sur 17, l'allèle le plus commun à une fréquence supérieure à 96%.

Tableau 3.3. Fréquences alléliques des échantillons *C. p. quinquefasciatus* de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso.

N, Nombre de moustiques; HW, probabilité exacte de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Locus	Abidjan1	Abidjan2	Abidjan3	Abidjan4	Bouaflé	Daloa	Katiola	Tafire	Ferké1
PGM									
(N)	66	46	46	46	48	48	48	41	31
1	.098	.087	.120	.141	.052	.031	.000	.049	.000
2	.894	.859	.859	.837	.948	.927	.906	.939	.952
3	.008	.054	.022	.022	.000	.042	.094	.012	.048
HW	0.54	1	0.05	0.30	1	1	1	1	1
MPI									
(N)	65	48	47	46	48	46	47	41	31
1	.000	.000	.000	.000	.000	.033	.000	.000	.000
2	.092	.042	.096	.130	.240	.174	.287	.463	.339
3	.677	.698	.723	.543	.365	.457	.521	.268	.468
4	.023	.021	.032	.043	.000	.000	.000	.000	.000
5	.208	.240	.149	.283	.396	.337	.191	.268	.194
HW	0.56	1	0.46	0.68	0.84	0.50	0.83	0.85	0.88
GOT1									
(N)	67	47	46	46	48	48	46	41	31
1	.007	.021	.011	.000	.000	.000	.000	.000	.000
2	.970	.979	.967	1.000	1.000	.990	.989	.963	1.000
3	.022	.000	.022	.000	.000	.010	.011	.037	.000
HW	1	1	1	-	-	-	-	0.04	-
GOT2									
(N)	67	44	43	46	47	47	45	41	29
1	.067	.091	.023	.065	.074	.085	.100	.171	.086
2	.933	.909	.977	.935	.926	.915	.900	.829	.914
HW	0.25	0.29	1	1	1	0.27	1	1	1

Locus	Ferké2	Korhogo1	Korhogo2	Ouangolo	Niangolo	Bobo	Boromo	Ouaga
PGM								
(N)	48	46	48	69	48	48	48	48
1	.010	.054	.031	.014	.010	.000	.000	.042
2	.958	.870	.917	.928	.958	.958	.896	.948
3	.031	.076	.052	.058	.031	.042	.104	.010
HW	1	0.10	1	1	1	1	0.41	0.10
MPI								
(N)	45	48	48	64	45	45	45	43
1	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
2	.433	.427	.240	.375	.411	.422	.233	.302
3	.367	.354	.500	.516	.400	.467	.533	.477
4	.011	.021	.031	.016	.100	.067	.044	.000
5	.189	.198	.229	.094	.089	.044	.189	.221
HW	0.15	0.50	0.04	0.13	0.06	0.72	0.91	0.29
GOT1								
(N)	47	45	48	64	47	48	46	47
1	.000	.000	.010	.016	.000	.000	.000	.000
2	1.000	.978	.990	.945	1.000	1.000	1.000	1.000
3	.000	.022	.000	.039	.000	.000	.000	.000
HW	-	1	-	0.16	-	-	-	-
GOT2								
(N)	47	45	48	55	47	46	47	45
1	.128	.144	.135	.182	.160	.130	.149	.222
2	.872	.856	.865	.818	.840	.870	.851	.778
HW	0.55	0.57	0.18	1	0.58	1	1	0.66

L'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus est vérifié dans la quasi totalité des échantillons ($P > 0.05$). Un écart à la panmixie ($P \leq 0.05$) est observé au locus PGM pour Abidjan3 ($P = 0.05$), au locus MPI pour Korhogo2 ($P = 0.04$), et au locus GOT1 pour Tafire ($P = 0.04$). Toutefois ces écarts ne sont pas significatifs si l'on corrige ces probabilités en tenant compte des autres tests (procédure séquentielle de Bonferroni).

L'analyse du déficit ou de l'excès d'hétérozygotes à chaque locus montre également que dans la majorité des échantillons, l'indice F_{IS} ne diffère pas significativement de 0 ($P > 0.05$) (Tab. 3.4). Un déficit d'hétérozygotes est observé au locus PGM pour Abidjan3 ($P = 0.036$), et au locus GOT1 pour Tafire ($P = 0.037$), et un excès d'hétérozygotes au locus MPI pour Korhogo2 ($P = 0.026$). Toutefois, comme précédemment, ces différences ne sont pas significatives lorsque l'on tient compte des autres tests. Sur l'ensemble des échantillons un excès d'hétérozygotes est observé pour le locus GOT1 mais celui ci n'est pas significatif. Sur l'ensemble des gîtes et l'ensemble des locus, les données ne montrent pas d'excès global d'hétérozygotes ($P = 0.414$).

Tableau 3.4. Ecart à la panmixie dans les populations de *C. p. quinquefasciatus* de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso.

F_{IS} : indice de Wright. P , Probabilité exacte de H_0 = "population à l'équilibre d'Hardy-Weinberg" lorsque l'hypothèse alternative H_1 est le déficit ($F_{IS} > 0$) ou l'excès d'hétérozygotes ($F_{IS} < 0$).

Populations	PGM		MPI		GOT1		GOT2	
	F_{IS}	P	F_{IS}	P	F_{IS}	P	F_{IS}	P
Abidjan1	-0.102	0.463	+0.002	0.620	-0.017	0.955	+0.174	0.250
Abidjan2	-0.110	0.373	-0.000	0.570	-0.011	0.989	+0.186	0.294
Abidjan3	+0.308	0.036	+0.053	0.532	-0.015	0.967	-0.012	0.988
Abidjan4	-0.080	0.360	-0.030	0.306	-	-	-0.059	0.840
Bouaflé	-0.044	0.896	-0.042	0.391	-	-	-0.070	0.787
Daloa	-0.048	0.791	+0.003	0.477	-	-	+0.191	0.277
Katiola	-0.093	0.662	-0.107	0.178	-	-	-0.100	0.642
Tafire	-0.042	0.879	+0.061	0.338	+0.661	0.037	-0.021	0.689
Ferké1	-0.034	0.951	-0.009	0.530	-	-	-0.077	0.829
Ferké2	-0.025	0.937	-0.097	0.096	-	-	+0.055	0.552
Korhogo1	+0.086	0.341	+0.116	0.123	-0.011	0.989	-0.158	0.364
Korhogo2	-0.058	0.729	-0.098	0.026	-	-	+0.209	0.184
Ouangolo	-0.058	0.704	-0.088	0.115	+0.261	0.085	+0.031	0.561
Niangoloko	-0.025	0.937	+0.058	0.298	-	-	-0.179	0.265
Bobo-Diou.	-0.033	0.594	+0.119	0.297	-	-	-0.139	0.439
Boromo	+0.117	0.406	+0.049	0.396	-	-	+0.004	0.679
Ouagadougou	+0.382	0.063	+0.056	0.457	-	-	+0.111	0.359
Tous échant.	+0.007	0.511	-0.0004	0.177	+0.152	0.018	+0.011	0.315

3.3.1.2. Déséquilibres de liaison

Sur les 102 combinaisons alléliques possibles pour les 17 échantillons, 78 tests ont pu être effectués parce que les deux locus étaient polymorphes. Pour 72 de ces tests il n'existe pas d'association allèlique ($P > 0.05$). Pour les six tests où $P < 0.05$, l'association allèlique n'est pas significative lorsque l'on tient compte des autres tests (procédure séquentielle de Bonferroni). Ces résultats montrent une absence de déséquilibre de liaison au sein de chaque échantillon. En considérant globalement les 17 populations, il n'existe pas non plus d'association allèlique à chaque paire de locus ($P > 0.18$). On peut donc conclure que les informations apportées par chacun des locus étudiés sont indépendantes les unes des autres.

3.3.2. Structure des populations de *C. p. quinquefasciatus*

Compte tenu des faibles informations apportées par le locus GOT1 qui est pratiquement monomorphe, seuls ont été considérés les locus PGM, MPI et GOT2 dans la suite de l'analyse

3.3.2.1. Différenciation des populations

Sur l'ensemble des 17 échantillons on observe une différenciation fortement significative ($P < 0.0001$) à laquelle contribuent les trois locus (Tab. 3.5).

Tableau 3.5. Différenciation génétique des populations de *C. p. quinquefasciatus* de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso,

Probabilité exacte à chaque locus et sur l'ensemble des locus de "H₀ = la distribution des génotypes est identique entre populations"; N, Nombre d'échantillons; en gras, valeurs de P significativement < 0.05 .

Comparaisons	N	PGM	MPI	GOT2	Total
Tous échantillons	17	< 10⁻⁴	< 10⁻⁴	< 10⁻⁴	<< 10⁻⁴
Intra-ville					
Abidjan	4	0.4305	0.1652	0.3356	0.2736
Ferké.	2	0.8054	0.4633	0.4566	0.7387
Korhogo	2	0.5666	0.0723	1	0.3201
Inter-villes					
Toutes villes	12	< 10⁻⁴	< 10⁻⁴	0.0009	<< 10⁻⁴
Côte d'Ivoire	8	< 10⁻⁴	< 10⁻⁴	0.0037	<< 10⁻⁴
Burkina Faso	4	0.0141	0.0002	0.3853	10⁻⁴

Dans les villes d'Abidjan, Ferkéssédougou et Korhogo, on n'observe pas de différenciation entre les différents quartiers, ni sur l'ensemble des locus ($P > 0.27$) ni pour aucun des locus ($P > 0.07$). Ainsi, à l'échelle d'une ville, l'ensemble des gîtes à *C. p. quinquefasciatus* peut être considéré comme une seule population panmictique.

Par conséquent, il est possible de regrouper les moustiques des différents quartiers pour chacune de ces trois villes. En analysant ainsi la structuration sur les 12 villes de notre étude, on observe une forte différenciation à l'ensemble des locus et pour chacun des locus pris individuellement. Cette différenciation est toujours présente lorsque l'on considère les populations de Côte d'Ivoire seule ou celles du Burkina Faso.

L'importance de la différenciation génétique peut être évaluée en estimant l'indice F_{ST} calculé en fonction des différents regroupements effectués sur les échantillons (Tab. 3.6).

Tableau 3.6. Indices F_{ST} pour les différents locus et l'ensemble des locus et estimation du nombre de migrants efficaces (N_m).

N, Nombre d'échantillons; N_m (F_{ST}), estimation de N_m par l'indice F_{ST} ; N_m (all. priv.), estimation de N_m par la méthode des allèles privés; en gras, F_{ST} significativement différents de 0 ($P < 0.05$); ^a, estimation de N_m impossible lorsque $F_{ST} < 0$; ^b, absence d'allèles privés.

Comparaisons	N	PGM	MPI	GOT2	Total	N_m (F_{ST})	N_m (all. priv.)
Tous échantillons	17	0.0170	0.0577	0.0139	0.0412	5.8	3.0
Intra-ville							
Abidjan	4	-0.0033	0.0102	0.0007	0.0050	49.7	^b
Ferké	2	-0.0104	0.0022	-0.0056	-0.0006	^a	22.5
Korhogo	2	-0.0025	0.0324	-0.0108	0.0167	14.7	^b
Inter-villes							
Toutes villes	12	0.0187	0.0575	0.0166	0.0418	5.7	2.1
Côte d'Ivoire	8	0.0179	0.0671	0.0153	0.0473	5.0	1.8
Burkina Faso	4	0.0139	0.0189	0.0009	0.0134	18.4	^b

On constate que les valeurs de F_{ST} sont faibles et jamais supérieures à 0,05. Ces valeurs sont très voisines sur l'ensemble des locus quand on considère l'ensemble des échantillons ou les échantillons provenant de l'ensemble des 12 villes ou seulement

celles de Côte d'Ivoire. Par contre, les 4 villes du Burkina Faso semblent moins différenciées les unes des autres que ne le sont entre elles celles de Côte d'Ivoire ($F_{ST} = 0.013$ contre $0,047$). Cette différence entre les deux pays peut être un simple artéfact de calcul résultant de la différence du nombre d'échantillons pris en compte.

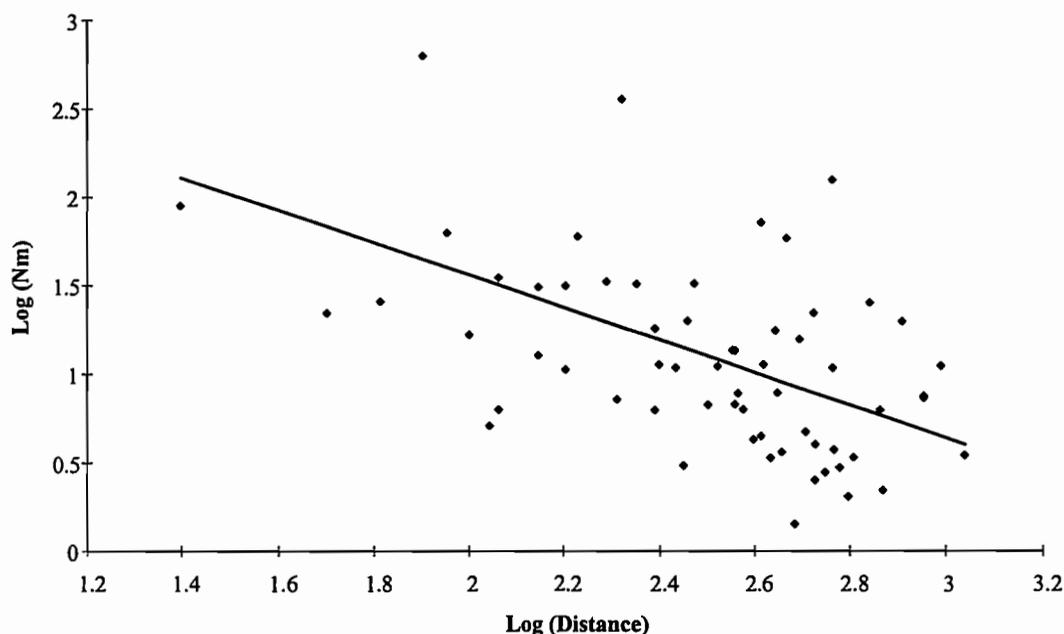
L'estimation du nombre de migrants efficaces par génération sur la base des F_{ST} et la méthode des allèles privés de Slatkin donnent des résultats comparables. Ainsi, bien que les valeurs de Nm soient différentes avec les deux méthodes (voir tableau 3.6), Nm est nettement plus fort entre échantillons prélevés dans une même ville, qu'entre l'ensemble des échantillons ou entre les échantillons provenant de villes différentes.

3.3.2.3. Echanges génétiques et distance géographique

Pour analyser l'intensité des flux géniques en fonction de la distribution spatiale des populations, nous avons étudié la relation entre les valeurs de F_{ST} pour chaque paire de villes et la distance géographique les séparant. L'analyse a été effectuée sur les 12 villes après regroupement des moustiques par quartiers pour trois d'entre elles (Fig. 3.2)

Cette analyse montre qu'il existe une corrélation significative entre la valeur $F_{ST}/(1-F_{ST})$ et la distance géographique, ce qui indique l'existence d'un isolement par la distance (Mantel test, $P = 0.003$). La pente de la droite de régression entre le $\log(Nm)$ et le \log de la distance est négative (-0.92) et montre que le nombre de migrants diminue lorsque la distance entre les villes augmente.

Figure 3.2. Relation entre le Log du nombre de migrants efficaces (Nm) et la distance (d) séparant les populations (en Log). [Formule de la régression entre Nm et d: $\text{Log}(\text{Nm}) = -0.92\text{Log}(d) + 3.40$]



3.4. Discussion

Les populations de *C. p. quinquefasciatus* présentent généralement une faible variabilité génétique par rapport à celles de *C. p. pipiens*. Une étude antérieure effectuée sur quatre populations d'Afrique de l'Ouest et une d'Afrique de l'Est a montré que sur 17 locus, 11 d'entre eux étaient monomorphes ou possédaient un allèle dont la fréquence était systématiquement supérieure à 96% (Urbanelli *et al.*, 1985). Cette faible variabilité a également été constatée au cours de notre étude puisque après des essais préliminaires sur une quinzaine de locus, seuls quatre ont pu être retenus pour les analyses. Il est intéressant de noter que dans une enquête récente, effectuée en Polynésie Française, les quatre mêmes locus sur douze au départ se sont révélés suffisamment polymorphes pour permettre une interprétation des données (Pasteur *et al.*, 1995).

Au sein d'une même ville il n'existe pas de différenciation entre les populations indiquant que les moustiques peuvent être considérés à cette échelle comme un ensemble panmictique. Cette observation est en accord avec le fait que les niveaux de

résistance aux insecticides ne diffèrent pas significativement d'un quartier à l'autre (cf. chapitre 2).

Sur l'ensemble de notre zone d'étude et dans chacun des deux pays la différenciation génétique entre les populations est significative. Cette différenciation est d'autant plus forte que les villes sont éloignées. Cela indique un isolement par la distance, c'est à dire une diminution des flux géniques en fonction de l'éloignement géographique croissant des populations. Ces résultats suggèrent que l'extension des différents gènes de résistance en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso est due à des phénomènes de migration, de proche en proche, entre les populations de *C. p. quinquefasciatus*.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la distribution de l'allèle *Ace.1^R* s'arrêtait à la ville frontière du Burkina Faso, Niangoloko, qui semblait jouer le rôle de barrière au flux génique. Or notre étude des flux géniques sur la base des locus neutres ne révèle pas de diminution du brassage génétique entre Niangoloko et les autres villes du Burkina par rapport à celles de Côte d'Ivoire. Ces résultats suggèrent donc qu'un autre facteur intervient pour expliquer la distribution d'*Ace.1^R*. Il est probable que la pression de sélection permettant à *Ace.1^R* de progresser dans les autres villes du Burkina Faso est insuffisante ou que la progression géographique de *Ace.1^R* soit en cours et que l'allèle n'ait pas encore atteint ces villes. Toutefois, il faut noter que l'estimation du flux génique mesure les échanges génétiques qui existent ou ont existé dans le passé entre les populations. Niangoloko est une ville peu urbanisée et la densité de gîtes larvaires à *C. p. quinquefasciatus* y est très faible. Il est possible ainsi que la faible différenciation de la population de Niangoloko avec le reste du Burkina Faso résulte plus d'une implantation récente de ce moustique à partir d'autres populations de ce pays. Et dans ce cas il n'est pas exclu que les échanges génétiques avec les villes de ce pays puissent dans une certaine mesure être relativement restreints à l'heure actuelle.

Une étude similaire à celle faite ici en Afrique de l'Ouest, a été effectuée en Espagne et en France, le long d'un transect allant de Valence à Nice sur des populations de *C. p. pipiens*. Elle a montré que chez cette dernière sous-espèce il n'y avait pas

d'isolement par la distance sur un territoire de 850 km. Cette différence de résultats entre l'Europe et l'Afrique de l'Ouest s'explique probablement par les différences des milieux écologiques occupés par ces moustiques et de l'urbanisation des deux régions. Le littoral méditerranéen est très fortement urbanisé et, hors des villes, *C. p. pipiens* est capable de coloniser des gîtes dans des zones moins anthropisées. Ses populations ont probablement une distribution plus ou moins continue qui expliquerait l'intensité des flux géniques et l'absence d'isolement par la distance. Par contre, en Afrique de l'Ouest *C. p. quinquefasciatus* est essentiellement inféodé au milieu urbain et il est absent dans les zones rurales. Sa distribution est plus discontinue et favorise ainsi localement la différenciation de ses populations.

3.5. Conclusion

L'estimation des flux géniques à partir de l'analyse de la structure génétique des populations fait appel à des modèles mathématiques encore relativement récents. Ces modèles sont affinés progressivement et permettent de décrire de plus en plus précisément les phénomènes observés dans les populations naturelles. Toutefois l'interprétation de ces résultats est relativement délicate et doit aussi s'appuyer sur les connaissances que l'on a de la biologie de l'espèce étudiée (Rousset, 1997; Bossart et Prowell, 1998). Ces études présentent l'avantage par rapport aux estimations directes du flux génique (marquage-recapture) d'apporter des informations sur ce qui se passe entre des populations même très éloignées mais aussi de déterminer l'impact réel des migrants en termes d'apport génétique. En ce sens, le développement de ces études devrait permettre de mieux cerner les modes de dispersion des gènes de résistance et d'améliorer les stratégies de lutte et de gestion de la résistance dans les populations d'insectes.

4. Résistance d'*Anopheles gambiae s.l.* aux pyréthrinoides

4.1. Introduction

Le paludisme est une endémie en pleine recrudescence dans les pays tropicaux depuis l'arrêt du programme global d'éradication en 1970 (Mouchet, 1990). Il représente actuellement la deuxième cause de morbidité avec une incidence annuelle de 300 à 500 millions de cas et il serait responsable d'environ 1.7 à 2.5 millions de décès par an, principalement chez les enfants de moins de 5 ans (WHO, 1998). Dans le monde, c'est l'Afrique sub-saharienne où l'on recense plus de 90% du total de la mortalité palustre qui connaît le plus fort niveau d'endémicité. Dans certains pays africains, cette maladie est directement ou indirectement responsable de 25% de la mortalité infantile (Shidrawi et Beales, 1998). *An. gambiae s.l.* étant le principal vecteur du paludisme en Afrique, il représente sans aucun doute l'une des espèces les plus importantes en matière de santé publique.

4.1.1. Le complexe *An. gambiae* Giles 1902

An. gambiae s.l. est un complexe de 6 espèces jumelles dont l'importance au niveau épidémiologique est très variable. *An. gambiae s.s.* Giles 1902 et *An. arabiensis* Patton 1905, sont les deux espèces les plus anthropophiles et les meilleurs vecteurs. *An. gambiae s.s.* est un vecteur des zones de forêts mais il pénètre assez profondément dans

les zones de savanes. *An. arabiensis* est présent dans les zones de savanes sèches, sur les plateaux d'Afrique méridionale et pénètre assez loin dans les zones de savanes humides où il est présent en sympatrie avec *An. gambiae s.s.* Leurs larves se développent dans des collections d'eau claire éventuellement temporaires, peu profondes, ensoleillées et avec peu ou pas de végétation (empreintes de pas, de roues, fossés, flaques, rizières etc...). Les femelles sont essentiellement endophages et endophiles. Toutefois, en fonction des conditions environnementales, elles peuvent devenir plus zoophiles, exophages, et exophiles, surtout *An. arabiensis* (Robert *et al.*, 1989b).

An. melas Theobald 1903 et *An. merus* Doenitz 1902 sont des espèces d'eaux saumâtres localisées respectivement sur la côte Ouest et la côte Est de l'Afrique. Moins anthropophiles que les précédentes, ce sont de médiocres vecteurs.

An. quadriannulatus Theobald 1911 est limité à quelques pays d'Afrique de l'Est et Méridionale. Il est présent dans les mêmes gîtes larvaires qu'*An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis*. Les femelles étant strictement zoophiles, il n'a pas de rôle vecteur.

An. bwambae White 1985 est localisé à une zone forestière d'Ouganda. Il se développe uniquement dans l'eau minéralisée des sources chaudes et a donc un rôle anecdotique.

Bien que leur écologie diffère notablement, ces espèces sont pratiquement identiques morphologiquement. Leur différenciation est basée sur la morphologie des chromosomes polyténiques (Coluzzi *et al.*, 1979), sur l'utilisation de locus discriminants par électrophorèse des isoenzymes (Mahon *et al.*, 1976; Miles, 1978) et plus récemment sur des tests diagnostiques par PCR (Scott *et al.*, 1993).

L'isolement génétique entre les espèces n'est pas total. Au laboratoire, les mâles issus de croisements interspécifiques sont stériles mais les femelles présentent une fertilité plus ou moins normale (Davidson *et al.*, 1964). Sur le terrain, des femelles hybrides *gambiae-arabiensis* ont été observées en Tanzanie, au Nigeria et au Burkina Faso à des fréquences de l'ordre de 0.2-0.3% ainsi que des femelles hybrides *arabiensis-quadriannulatus* en Afrique de l'Est (White, 1974; Coosemans *et al.*, 1998). Les conséquences exactes de la présence d'hybrides dans les populations naturelles sont mal appréciées mais elles témoignent indiscutablement du risque de l'existence de flux

géniques d'une espèce à l'autre. Une étude récente basée sur la comparaison de l'ADN mitochondrial suggère également l'existence de flux géniques importants entre *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* (Besansky *et al.*, 1997). Cette conclusion s'appuie sur la faible divergence génétique observée entre les deux espèces mais il est possible qu'elle résulte aussi de la conservation du polymorphisme de l'ADN ancestral commun. Cependant, le transfert de gènes de résistance d'une espèce à l'autre n'a jusqu'à présent jamais été mis en évidence sur le terrain dans les zones où elles sont en sympatrie.

4.1.2. *An. gambiae* et la résistance aux insecticides

La résistance d'*An. gambiae* est apparue pour la première fois en Afrique de l'Ouest (Nord Nigeria) en 1954, quelques mois seulement après les premiers traitements à la dieldrine. Limitée à quelques localités au départ, celle-ci s'est rapidement étendue à l'ensemble de la zone traitée mais également aux zones voisines non traitées (Armstrong *et al.*, 1958). Au Burkina Faso, une résistance à la dieldrine a été observée en 1957, dans les environs de Bobo-Dioulasso et l'année suivante elle fut trouvée dans un rayon de 150 km, y compris dans les villages les plus éloignés des zones de traitements (Hamon et Garrett-Jones, 1963). En Côte d'Ivoire, les premiers cas de résistance à la dieldrine furent observés dans la région d'Abidjan en 1958 (Adam *et al.*, 1958) mais rapidement plusieurs enquêtes entomologiques montrèrent son extension à l'ensemble du pays (Hamon *et al.*, 1963; Hamon et Garrett-Jones, 1963). Dans le même temps, la résistance à la dieldrine a été détectée dans la plupart des autres pays non seulement d'Afrique de l'Ouest mais de l'ensemble du continent africain.

La fréquence du gène de résistance à la dieldrine s'est révélée généralement très élevée dans les populations de moustiques. L'exemple le plus remarquable ayant été observé au Sud Cameroun, où la recolonisation des zones dans lesquelles *An. gambiae* avait complètement disparu s'est faite à partir de populations homozygotes résistantes transportées par voie ferrée depuis la côte (Gariou et Mouchet, 1961). Si dans certains cas, les traitements effectués en santé publique semblent avoir été à l'origine de la résistance à la dieldrine, la principale cause de son extension résulte, de toute évidence,

de l'emploi massif des cyclodiènes et du lindane en agriculture pour le traitement du coton, du café et du cacao (Mouchet, 1988).

Contrairement à la dieldrine, la résistance d'*An. gambiae* au DDT a été plus lente à apparaître et surtout beaucoup plus localisée. Le premier cas a été détecté en 1967 à Bobo-Dioulasso, soit sept ans après l'arrêt complet des traitements insecticides en santé publique (Hamon *et al.*, 1968). Par contre, son apparition a coïncidé avec l'introduction massive d'une formulation à base de DDT et d'endrine pour la protection du coton. Par la suite la résistance au DDT a été décelée en Côte d'Ivoire, au Nigeria et dans plusieurs localités du Mali (Coz *et al.*, 1968; Touré, 1982; 1984). Elle est mentionnée par l'OMS (1992) principalement en Afrique de l'Ouest et dans cinq autres pays, dont deux où il s'agit probablement d'*An. arabiensis* (Tanzanie, Afrique du Sud). Chez *An. arabiensis*, elle a été décrite au Sénégal, au Soudan, en Tanzanie, en Ethiopie et au Swaziland.

La rareté des cas de résistance au DDT s'explique en partie par les propriétés très excito-répulsives de ce produit à l'égard des moustiques. Au contact des surfaces imprégnées de DDT, les moustiques sont fortement irrités et une partie d'entre eux fuient les maisons traitées avant d'avoir "pris" une dose létale d'insecticide. Dans la mesure où les anophèles sont à même de modifier leur comportement trophique, selon les circonstances ils peuvent être plus zoophiles et plus exophages. Piquant le bétail à l'extérieur des habitations, ils peuvent ainsi échapper à la pression de sélection engendrée par le DDT utilisé en pulvérisations intradomiciliaires. Ce phénomène est un des facteurs importants à l'origine de l'échec des campagnes au DDT dans les zones de paludisme stable où la maladie n'a jamais pu être contrôlée comme prévu. En revanche, dans les zones de paludisme instable où la transmission est faible, son effet fut suffisant pour la contrôler efficacement.

La résistance aux autres insecticides est mal documentée. Le seul cas de résistance aux organophosphorés concerne *An. arabiensis* vis à vis du malathion et du phenthoate au Soudan (Hemingway, 1983). Ce n'est que récemment qu'une résistance aux pyréthrinoides, a été observée pour la première fois en Côte d'Ivoire à Bouaké par Elissa *et al.* (1993).

4.2. Remarque préliminaire sur le dépistage de la résistance (épreuves OMS et doses diagnostiques)

L'évaluation en routine de la sensibilité des moustiques adultes aux insecticides fait généralement appel au test diagnostique de l'OMS (1970). Il présente les avantages d'être simple d'utilisation, rapide, peu coûteux, de donner des résultats reproductibles et de ne nécessiter qu'un petit nombre d'individus par rapport aux bioessais classiques. Il est largement employé depuis des décennies, par les équipes qui, sur le terrain, sont chargées du suivi de la résistance dans les populations de moustiques faisant l'objet d'un programme de lutte.

Le principe du test OMS consiste à mettre en contact des moustiques (généralement des femelles) avec un papier imprégné d'insecticide à une dose donnée (*i.e.* concentration diagnostique) et pendant un temps donné (en général une heure), censés induire 100% de mortalité chez des individus sensibles au bout de 24 heures d'observation. Le matériel et les papiers imprégnés sont distribués exclusivement par l'OMS pour limiter les facteurs de variation d'un laboratoire à l'autre. Dans un souci de simplification, pour chaque insecticide, l'OMS tente de définir dans la mesure du possible une seule concentration diagnostique, consensuelle pour tous les insectes d'intérêt médical. Toutefois, l'utilisation d'une dose unique pour plusieurs espèces pose des problèmes d'interprétation dans la mesure où la sensibilité de base des insectes est très variable d'une espèce à l'autre. *C. p. quinquefasciatus* est par exemple beaucoup moins sensible par contact tarsal au DDT que les anophèles (Brown et Pal, 1973).

Les risques liés à l'utilisation d'une concentration diagnostique incorrecte sont:

- lorsqu'elle est trop faible, de surestimer la résistance (faux positifs) et par conséquent de rejeter éventuellement un insecticide alors qu'il est encore efficace sur le terrain,
- lorsqu'elle est trop forte, de dépister la résistance trop tard alors que la baisse de sensibilité aurait pu être anticipée.

Au cours de notre étude sur *An. gambiae s.l.*, il est apparu que la dose diagnostique de 0.25%¹ avec la perméthrine 25/75 (ratio des isomères cis/trans) était trop faible, alors que celle de la lambda-cyhalothrine 0.1% était trop forte. Nous avons ainsi été amenés à contester la validité des concentrations diagnostiques proposées par l'OMS pour les principaux pyréthrinoides (Duchon *et al.*, 1997). Pour *An. gambiae*, les concentrations diagnostiques devraient être de 1% pour la perméthrine 25/75 et de 0.05% pour la lambda-cyhalothrine.

4.3. Répartition de la résistance aux pyréthrinoides d'*An. gambiae s.l.* en Afrique

Article 5 - Chandre F., F. Darriet, L. Manga, M. Akogbeto, O. Faye, J. Mouchet and P. Guillet. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae s.l.* *Bulletin of the World Health Organization*. 77: sous presse.

L'objectif de cette étude était de confirmer la présence à Bouaké de la résistance d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoides et au DDT, et d'évaluer son étendue géographique non seulement en Côte d'Ivoire mais également dans d'autres pays d'Afrique.

Les tests OMS ont été pratiqués sur des femelles sauvages d'*An. gambiae s.l.* provenant de quatre pays d'Afrique de l'Ouest (Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Sénégal), un pays d'Afrique centrale (Cameroun) et un pays d'Afrique Méridionale (Botswana). Les moustiques ont été exposés pendant une heure aux concentrations diagnostiques pour la perméthrine (0.25%), la deltaméthrine (0.025%) ou le DDT (4%). En plus du critère de la mortalité à 24 heures, nous avons complété le test par l'observation des moustiques assommés (knockdown) au cours de l'exposition à l'insecticide. L'évolution du pourcentage de moustiques knockdown en fonction du temps a été analysée selon un modèle log-probit (Finney, 1971) afin de déterminer les temps de knockdown, KdT_{50} et KdT_{95} .

¹ Les doses diagnostiques des papiers OMS sont exprimées en pourcentage d'insecticide dans la solution servant à l'imprégnation. 1% correspond à une dose de 364 mg/m².

4.3.1. Mortalité au test OMS

La concentration diagnostique de la perméthrine induisant une mortalité de 80 à 100% pour la souche sensible de référence (Kisumu), nous avons considéré les moustiques comme résistants lorsque la mortalité était inférieure à 70%. Pour les deux autres insecticides les seuils de mortalité en dessous desquels les moustiques ont été considérés résistants étaient 95% pour la deltaméthrine et 90% pour le DDT (Tab. 4.1).

Tableau 4.1. Pourcentages de mortalité des femelles sauvages d'*An. gambiae s.l.* 24 heures après l'exposition au test OMS.

^a Concentrations diagnostiques. ^b S, Sensible; R, Résistant; S*, Sensible aux pyréthrinoides mais baisse de sensibilité au DDT.

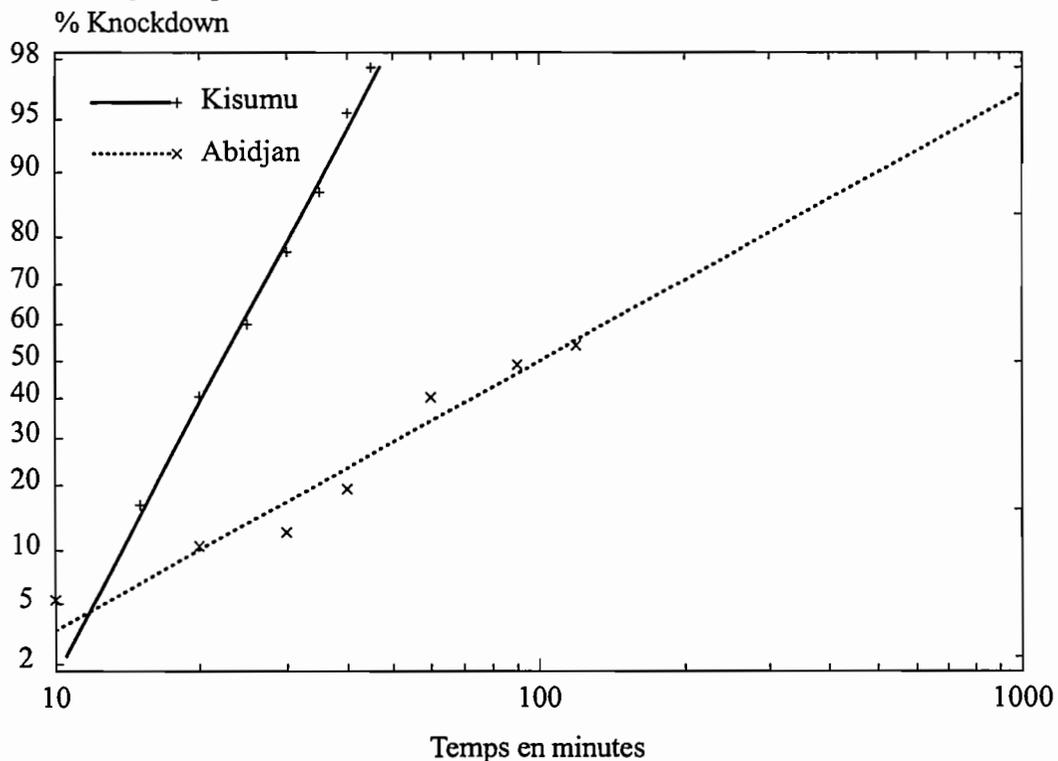
Pays	Localité	Perméthrine 0.25% ^a	Deltaméthrine 0.025 % ^a	DDT 4% ^a	Statut ^b
Référence sensible	Kisumu	86.8	100	100	S
Botswana	Sebina	86.3	-	99.6	S
Cameroun	Yaounde	85.2	100	90.0	S
Sénégal	Dakar	76.2	-	-	S
Burkina Faso	Vallée du Kou	29.2	95.2	67.3	R
Côte d'Ivoire	Abidjan	75.4	-	75.8	S*
	Bouake	48.0	98.4	-	R
	Odienne	61.9	-	-	R
	Kafine	54.5	-	-	R
	Daloa	50.0	-	-	R
	Katiola	69.2	-	-	R
	Korhogo	7.3	30.6	7.1	R
	Yaokoffikro	10.0	28.4	17.6	R
Bénin	Cotonou 1	38.9	-	-	R
	Cotonou 2	20.2	18.7	11.5	R
	Cotonou 3	34.1	-	-	R

La résistance d'*An. gambiae s.s.* à la perméthrine est observée dans la plupart des localités de Côte d'Ivoire ainsi qu'au Burkina Faso et au sud du Bénin. Elle est associée à une résistance croisée à la deltaméthrine et au DDT. Les tests réalisés avec les moustiques du Sénégal (*An. arabiensis*), du Cameroun (*An. gambiae s.s.*) et du Botswana (*An. arabiensis*) indiquent une sensibilité normale aux pyréthrinoides et au DDT.

4.3.2. Effet knockdown des pyréthrinoides

La relation entre le pourcentage de moustiques knockdown et le temps d'exposition est généralement bien représentée par une droite. La résistance aux pyréthrinoides s'accompagne d'une augmentation significative des KdT pouvant aller jusqu'à la disparition complète de l'effet knockdown pour les échantillons les plus résistants. La baisse de l'effet knockdown est plus marquée avec la perméthrine qu'avec la deltaméthrine. Mais surtout comme dans le cas d'Abidjan (Fig. 4.1), elle peut survenir avant même qu'un effet significatif sur la mortalité ne soit observé. La mesure de l'effet knockdown qui a été depuis longtemps considéré par plusieurs auteurs comme un critère d'efficacité des pyréthrinoides ou de détection de la résistance (Privora, 1975; Hemingway, 1980) semble être un meilleur indicateur que la mortalité pour une détection précoce de la résistance.

Figure 4.1. Relation entre le pourcentage de moustiques knockdown et le temps d'exposition à la perméthrine 0.25% chez *An. gambiae s.s.* pour une souche sensible (Kisumu) et une population sauvage (Abidjan) diagnostiquée comme sensible sur la base de la mortalité au test OMS.



Cette première enquête a révélé que la résistance aux pyréthrinoides et au DDT était déjà largement répandue en Afrique de l'Ouest. Sa répartition actuelle correspond en fait aux zones où la résistance au DDT a été décrite dans le passé. Il est hautement probable que la résistance sélectionnée par l'utilisation massive du DDT en agriculture se soit maintenue dans les populations d'*An. gambiae* sous la pression des pyréthrinoides utilisés depuis plusieurs années pour la protection des cultures ou éventuellement pour l'hygiène domestique.

4.4. Le gène *kdr*, responsable de la résistance aux pyréthrinoides chez *An. gambiae*

Article 6 - Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Bergé J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N., Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. 7: 179-184.

Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration entre l'INRA (Antibes), le CNRS (Montpellier), l'IACR (Rothamsted, UK) et l'ORSTOM.

4.4.1. Le canal Sodium voltage dépendant

Les Canaux Sodium Voltage Dépendant (CNaVdp) interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Ces canaux une fois activés (*i.e.* en position ouverte) entraînent un flux d'ions Sodium du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation de la membrane cellulaire ne dure que quelques millisecondes et le canal revient spontanément à l'état de repos (*i.e.* fermé). Elle provoque l'activation des CNaVdp situés à proximité et de proche en proche engendre une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux (Chapman, 1969).

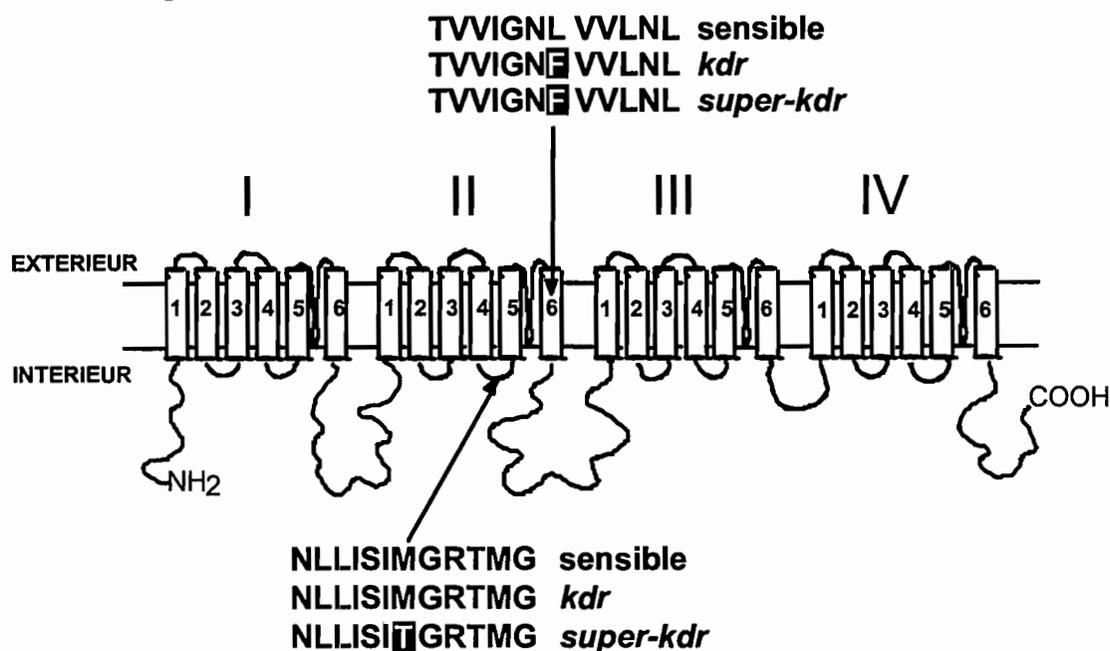
Les pyréthrinoides et le DDT agissent en modifiant la cinétique d'inactivation des CNaVdp. Deux types d'altérations sont observées selon les pyréthrinoides (Gammon

et al., 1981; Lund et Narahashi, 1983). Les pyréthrinoides de type I (non cyanés) et le DDT maintiennent les canaux en position ouverte de façon transitoire et entraînent des décharges répétées de potentiel d'action. Ceux du groupe II (cyanés) conservent les canaux ouverts plus longtemps et maintiennent la membrane dépolarisée sans provoquer de telles décharges.

La résistance de type *kdr* (knockdown resistance) se caractérise par une moindre sensibilité du système nerveux à ces insecticides. Elle est due à une diminution de l'affinité entre l'insecticide et son site de fixation sur le CNaVdp (Pauron *et al.*, 1989).

Le CNaVdp est une protéine transmembranaire de 1800 acides aminés. Elle comporte 4 domaines homologues répétés, comprenant chacun six segments hydrophobes intramembranaires (fig. 4.2). Chez la mouche domestique, *Musca domestica*, la résistance de type *kdr* est associée à une mutation ponctuelle du gène codant pour le CNaVdp. Cette mutation entraîne le remplacement d'un seul acide aminé (Leucine → Phénylalanine) sur le segment S6 du domaine II (fig. 4.2) (Williamson *et al.*, 1996b). La même mutation est également responsable de la résistance de type *kdr* chez la blatte *Blattella germanica* (Miyazaki *et al.*, 1996), le puceron *Myzus persicae* ainsi qu'un microlépidoptère, *Plutella xylostella* (Martinez-Torres *et al.*, 1997). Chez certaines souches de mouches domestiques appelées *super-kdr* en raison de leur très forte résistance aux pyréthrinoides de type II, une deuxième mutation ponctuelle a été observée à proximité de la mutation *kdr* (Williamson *et al.*, 1996b).

Figure 4.2. Représentation schématique du CNaVdp et emplacement des mutations *kdr* et *super-kdr* chez *Musca domestica*. (D'après Williamson *et al.*, 1996b)



Nos premières enquêtes ayant mis en évidence une résistance croisée DDT-pyréthrinoïdes associée à une baisse de leur effet knockdown, l'existence du gène *kdr* dans les populations d'*An. gambiae s.s.* en Afrique de l'Ouest a été fortement soupçonnée. Nous avons donc recherché si la mutation observée chez les autres espèces d'insectes était aussi présente dans les populations d'*An. gambiae s.s.* d'Afrique de l'Ouest

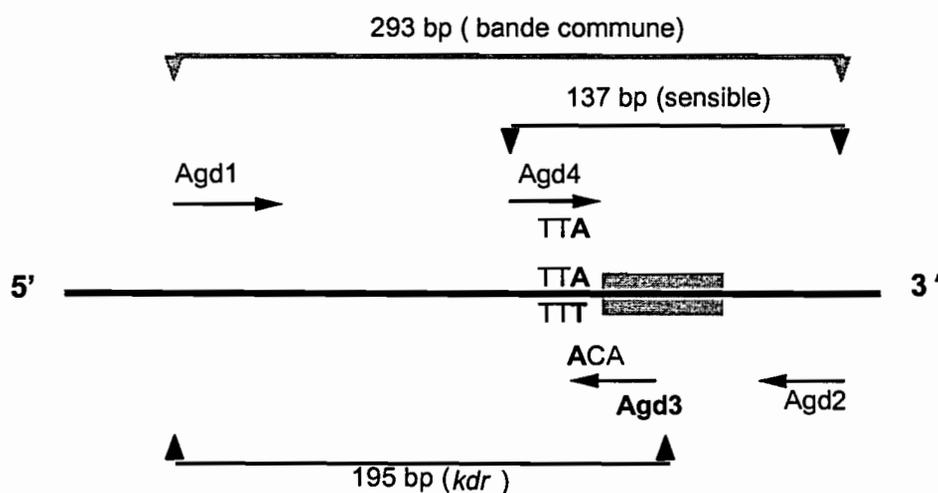
4.4.2. Séquence du CNaVdp et test diagnostique de la mutation *kdr*

Le séquençage partiel du gène codant pour le CNaVdp a été réalisé sur deux souches résistantes d'*An. gambiae s.s.* et deux souches sensibles de référence. Les deux souches résistantes, Kou (Burkina Faso) et Tola (Côte d'Ivoire), sont issues de populations naturelles résistantes, ultérieurement sélectionnées avec la perméthrine au laboratoire pendant plusieurs générations. Les deux souches sensibles de référence, Kisumu (Kenya) et Bobo (Burkina Faso) ont été maintenues depuis plusieurs années sans pression de sélection.

A partir de l'ARN total des moustiques, un fragment d'ADN complémentaire a été synthétisé. Le séquençage partiel de la région concernée a été effectué sur le produit de deux PCR successives à partir de l'ADNc. Sur les 407 paires de bases (pb) séquencées, un seul nucléotide diffère entre les souches sensibles et les souches résistantes. Ce changement situé au même niveau que chez les autres espèces correspond à la même mutation, le remplacement d'une leucine (TTA) chez les sensibles par une phénylalanine (TTT) chez les résistants.

Compte tenu qu'à l'exception de cette mutation, la séquence est totalement conservée entre trois souches d'Afrique de l'Ouest et une d'Afrique de l'Est, un test diagnostique de la mutation *kdr* chez *An. gambiae s.s.* a été défini. Ce test est basé sur une amplification spécifique des allèles sensible et résistant (PASA¹). Deux oligonucléotides asymétriques par rapport à la mutation servent d'amorces pour l'amplification d'une bande commune (293 pb) à tous les individus (Fig. 4.3). Deux autres oligonucléotides amplifient, l'un la séquence sensible (fragment de 137 pb) et l'autre la séquence résistante (195 pb). Ces trois bandes, de tailles différentes, sont facilement résolues sur gel d'agarose, et permettent ainsi la détermination aisée du génotype de chaque moustique (Fig. 4.3).

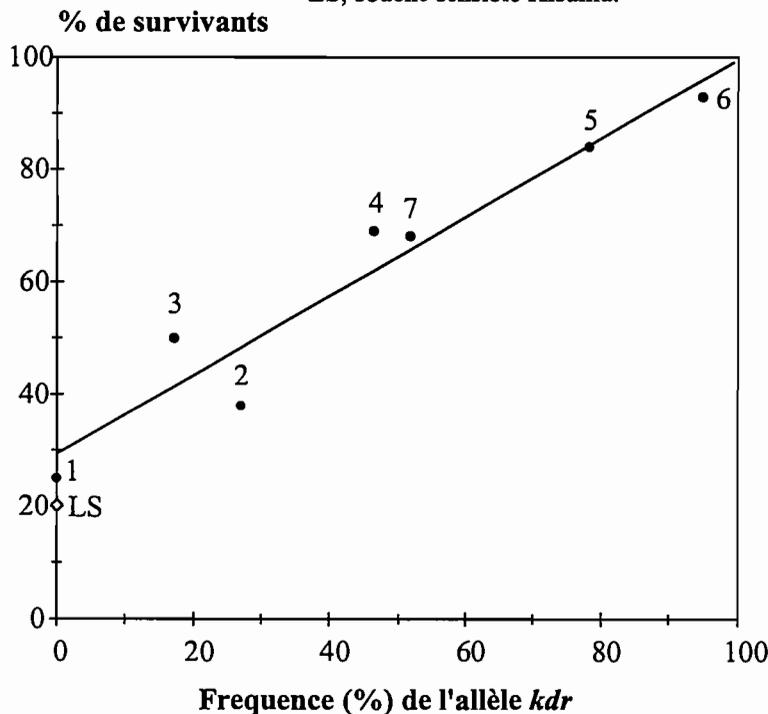
Figure 4.3. Représentation schématique du test diagnostique de la mutation *kdr*. Position des amorces oligonucléotidiques par rapport à la mutation; codons TTA (Leucine) chez les sensibles et TTT (Phénylalanine) chez les résistants. Le rectangle gris indique la position de l'intron 2.



¹ PASA = polymorphism of allele specific amplification.

Afin de vérifier sa validité, nous avons appliqué ce test sur des échantillons sauvages d'*An. gambiae s.s.* provenant de sept localités de Côte d'Ivoire et du Burkina Faso. Le niveau de résistance de chaque échantillon a été évalué en utilisant le test OMS avec la perméthrine. Les résultats ont montré que le pourcentage d'individus qui survivent après une exposition à la perméthrine est très significativement corrélé ($P = 0.0005$) avec la fréquence allélique de la mutation *kdr* (Fig. 4.4). Cette forte corrélation confirme que le gène *kdr* est le principal facteur de résistance aux pyréthrinoides dans ces populations.

Figure 4.4. Corrélation entre la fréquence de survivants à la perméthrine 0.25% et la fréquence allélique de la mutation *kdr* pour sept populations d'*An. gambiae s.s.* d'Afrique de l'Ouest ($y=0.70x + 29.3$; $r_{yx} = 0.96$; $P = 0.0005$ pour $H_0: r_{yx} = 0$).
1, Abidjan; 2, Odienné; 3, Daloa; 4, Kafiné; 5, Yaokoffikro; 6, Korhogo; 7, Vallée du Kou;
LS, souche sensible Kisumu.



4.4.3. Conclusion

L'existence de la même mutation *kdr* chez des espèces d'insectes appartenant à des ordres différents suggère que la gamme de mutations conduisant à une résistance et compatible avec le fonctionnement du CNaVdp est vraisemblablement restreinte. Toutefois, chez un ravageur agricole, *Heliothis virescens* la résistance *kdr* est associée à une mutation du même acide aminé mais aboutissant au remplacement d'une leucine par une histidine (Park et Taylor, 1997). Il semble donc que cet acide aminé joue un rôle

essentiel dans l'interaction entre le CNaVdp et les insecticides. D'autres mutations peuvent également être impliquées notamment chez *Heliothis* sp. au niveau du segment intracellulaire reliant les domaines III et IV du CNaVdp (Head *et al.*, 1998). Des études en cours dans notre laboratoire sur des souches provenant de plusieurs régions du globe suggèrent que deux ou trois autres mutations pourraient intervenir dans la résistance d'*Ae. aegypti* aux pyréthrinoides et au DDT.

Compte tenu de l'accroissement rapide des opérations de lutte envisagées contre les vecteurs du paludisme en Afrique, opérations basées essentiellement sur l'utilisation des pyréthrinoides, le test diagnostique du gène *kdr* est un outil particulièrement adapté au suivi de la résistance dans les populations de vecteurs soumises à ces opérations. Par rapport aux bioessais classiques il présente l'avantage de permettre une détection précoce de l'apparition du gène de résistance. En effet, lorsque la fréquence du gène est faible, celui-ci est essentiellement présent à l'état hétérozygote. Or, la mutation *kdr* étant récessive (Bourguet *et al.*, 1997a et chapitre 2.6.), les bioessais discriminent mal les hétérozygotes des homozygotes sensibles. De plus, lorsque la fréquence du gène est particulièrement faible, ce test permet de traiter rapidement de grandes quantités de moustiques en travaillant sur des pools. Il est effectivement possible de détecter un seul hétérozygote à partir de l'ADN extrait d'un broyat de 30 individus.

Notre laboratoire est impliqué dans une vaste enquête sur la répartition de la mutation *kdr* dans les populations d'*An. gambiae s.s.* à l'échelle du continent africain. Bien que le test ait été mis au point à partir des séquences d'*An. gambiae s.s.*, il permet également d'amplifier la bande commune et la bande sensible (la bande résistante n'ayant pour le moment pas été observée) chez *An. arabiensis* et *An. melas*. Il semble donc que la séquence du canal Sodium soit bien conservée, du moins chez ces trois espèces du complexe.

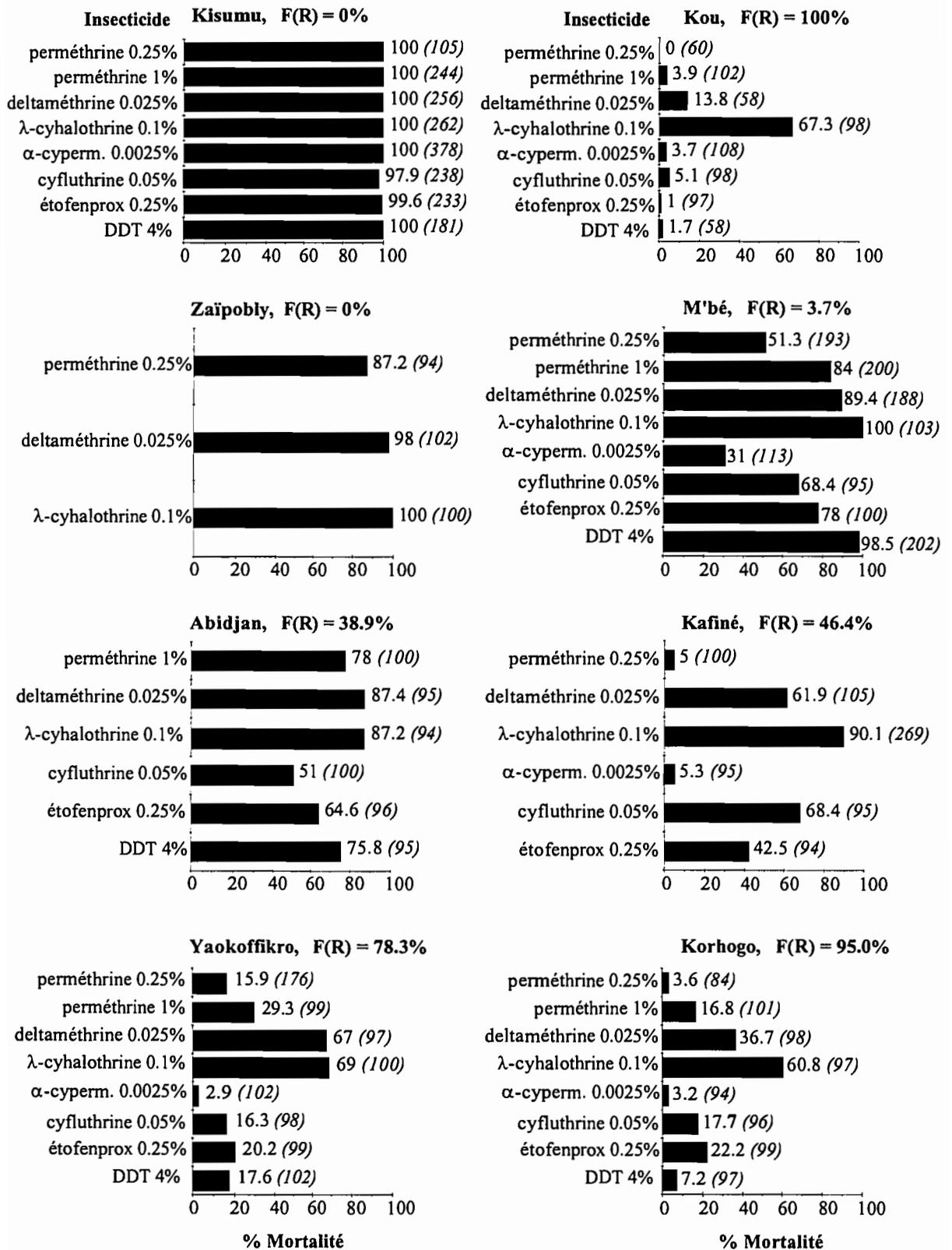
4.5. Résistance croisée induite par le gène *kdr*

Article 7 - Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., P. Carnevale, Guillet P. 1998. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15: sous presse.

Nous avons évalué le spectre de résistance croisée conférée par le gène *kdr* à plusieurs pyréthrinoides utilisables pour l'imprégnation des moustiquaires et des rideaux pour six échantillons d'*An. gambiae s.s.* de Côte d'Ivoire (Fig. 4.5). La résistance a été déterminée à partir des tests OMS avec 5 pyréthrinoides (alpha-cyperméthrine, cyfluthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, perméthrine), un pseudo-pyréthrinoides (étofenprox) et le DDT. Ces tests ont été effectués en parallèle avec les souches Kisumu (référence sensible) et Kou (homozygote pour la mutation *kdr*). Dans chaque échantillon, la fréquence de gène *kdr* a également été déterminée par PCR.

Figure 4.5. % Mortalité au test OMS avec différents insecticides pour six populations d'*An. gambiae* s.s. prélevées en Côte d'Ivoire, une souche sensible (Kisumu) et une souche résistante (Kou).

F(R), Fréquence allélique du gène *kdr*. Nombre de moustiques testés entre parenthèses.



La fréquence allélique de la mutation *kdr* déterminée à partir de 6 échantillons d'*An. gambiae s.s.* de Côte d'Ivoire, varie fortement d'une population à l'autre, allant de 0% (sensible) à 95% (majorité d'homozygotes résistants).

La souche Kou est résistante à l'ensemble des pyréthrinoides, ainsi qu'à l'étofenprox et au DDT (Fig. 4.5). Sur le terrain, seule la population de Zaïpobly est sensible. Dans les autres populations la présence du gène *kdr* engendre une diminution de la mortalité plus ou moins importante selon les insecticides. Dans le cas de la lambda-cyhalothrine, la mortalité systématiquement plus élevée s'explique par le fait que la concentration diagnostique préconisée par l'OMS (0.1%) est trop forte (paragraphe 4.2). Globalement, lorsque la fréquence du gène *kdr* augmente, la mortalité diminue et ce pour l'ensemble des insecticides testés. Toutefois, une corrélation significative entre la fréquence allélique de la mutation *kdr* et le pourcentage de survivants aux tests OMS n'est observée qu'avec le DDT, l'étofenprox et la lambda-cyhalothrine. Cela semble indiquer que pour ces trois insecticides, le gène *kdr* est le principal mécanisme de résistance impliqué. En revanche, cette corrélation n'est pas significative dans les autres cas, suggérant ainsi l'existence de mécanisme(s) supplémentaire(s) impliqué(s) dans la résistance. Par exemple, dans l'échantillon de M'bé, bien que la fréquence allélique du gène *kdr* ne soit que de 4% et la sensibilité au DDT normale, on obtient seulement 31% de mortalité avec l'alpha-cyperméthrine. Incidemment, il est intéressant de noter que cet insecticide n'a jamais été utilisé dans la lutte contre les moustiques mais qu'il représente 80-90% des pyréthrinoides appliqués sur le coton en Côte d'Ivoire (Vassal, comm. pers.).

Le DDT n'étant plus utilisé depuis plusieurs années, les fréquences parfois élevées du gène *kdr* montrent que les populations d'*An. gambiae s.s.* sont actuellement soumises à une forte pression de sélection et que cette pression est selon toute vraisemblance exercée par les pyréthrinoides. Il est possible que des mécanismes de détoxification spécifiques des pyréthrinoides tel que les oxydases ou les estérases, aient déjà été sélectionnés. L'étofenprox qui, contrairement aux pyréthrinoides classiques, ne possède pas la liaison ester n'est probablement pas dégradé selon les mêmes voies métaboliques. Cela permettrait d'expliquer pourquoi seule la résistance à cet insecticide,

et au DDT, qui est également dans le même cas, est fortement corrélée à la fréquence du gène *kdr* contrairement aux autres pyréthrinoides (excepté la lambda-cyhalothrine dont nous avons vu que la dose diagnostique est trop élevée).

Ces résultats sont apparemment contradictoires avec ceux du chapitre précédent où nous avons mis en évidence une forte corrélation entre la fréquence du gène *kdr* et la résistance à la perméthrine. Ils s'expliquent peut-être en partie par le faible nombre d'échantillons considérés ici, mais surtout par la population de M'bé qui présente une résistance non négligeable à la plupart des pyréthrinoides alors que sa fréquence allélique pour le gène *kdr* n'est que de 3.7%.

4.6. Impact du gène *kdr* sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées

Article 8 - Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S., Guillet P. 1998. Modifications of pyrethroid effects induced by *kdr* mutation in *An. gambiae s.s.* *Medical & Veterinary Entomology*. (soumis).

Plusieurs mécanismes conditionnent l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides:

- un effet knockdown qui permet "d'assommer"¹ ou de tuer la femelle avant qu'elle ne prenne son repas de sang.
- un effet excito-répulsif qui, d'une part, diminue le contact de la femelle avec le tissu imprégné, l'empêchant par là même de prendre un repas de sang, et d'autre part, induit une forte exophilie. Il permet également à la moustiquaire de conserver une relative efficacité lorsqu'elle est trouée ou mal bordée.
- un effet répulsif à distance, encore mal élucidé, qui se traduit par une diminution du taux de pénétration des moustiques dans les habitations.

¹ Un moustique knockdown même s'il n'est pas tué par l'insecticide a peu de chances de survivre dans les zones tropicales étant donné la présence de nombreux prédateurs terrestres tel que les fourmis qui les éliminent très rapidement et efficacement.

Nous avons évalué l'influence de la mutation *kdr* sur les différents effets des pyréthrinoides pour tenter de prévoir son impact sur la protection conférée par les moustiquaires imprégnées.

4.6.1. Niveau de résistance conférée par la mutation *kdr* chez les femelles d'*An. gambiae s.s.*

Le test OMS permet de détecter la présence d'individus résistants, mais sauf dans le cas où les génotypes peuvent être discriminés par différentes concentrations, il ne donne pas d'information précise sur le niveau de résistance. Pour évaluer ce dernier chez les adultes, certains auteurs ont proposé d'établir des courbes de régression de la mortalité en fonction du temps de contact avec l'insecticide. Toutefois, l'interprétation de ces données est souvent délicate du fait de la variabilité des résultats, elle même liée à l'hétérogénéité des quantités d'insecticide adsorbées par contact tarsal. Cela est particulièrement vrai avec les pyréthrinoides dont l'effet knockdown interrompt généralement le contact des moustiques avec le papier imprégné nettement avant la fin de la durée prévue d'exposition (Hemingway, 1980; Magesa *et al.*, 1994). C'est pourquoi nous avons eu recours aux applications topiques de perméthrine qui permettent de traiter chaque individu avec une quantité donnée et précise d'insecticide (Tab. 4.2).

Tableau 4.2. Doses létales de la perméthrine en application topique sur une souche sensible (Kisumu) et une souche résistante (Kou) d'*An. gambiae s.s.*
DL, Doses létales en nanogramme par milligramme de moustique et intervalles de confiance (95%) entre parenthèses. N, Nombre de moustiques testés.

Souche	DL ₅₀ (ng/mg)	DL ₉₅ (ng/mg)	RR ₅₀	RR ₉₅	N
Kisumu	1.024 (0.876-1.184)	4.447 (3.050-6.540)	--	--	480
Kou	43.988 (39.563-48.267)	126.730 (109.161-154.853)	43.0	28.5	559

Le niveau de résistance des femelles adultes de la souche Kou est d'environ 30 à 40 fois, ce qui est de l'ordre de grandeur de ce que l'on observe chez d'autres souches d'insectes *kdr* (Williamson *et al.*, 1996a). Par ailleurs, cette résistance est associée à une

plus forte résistance au niveau des larves, 100 à 300 fois, pour la souche Kou (Darriet *et al.*, 1997).

4.6.2. Effet knockdown et mortalité au test OMS.

Il a été montré (paragraphe 4.3) que les temps de knockdown observés sur des moustiques provenant de populations sauvages peuvent être significativement rallongés sans que l'on observe pour autant un effet significatif sur la mortalité. Nous avons donc étudié l'influence des différents génotypes sur la sensibilité à l'effet knockdown, en parallèle sur les souches de laboratoire Kisumu (SS), Kou (RR) et leurs hybrides de première génération (RS). Des tests ont également été faits avec des mélanges en proportion connue d'homozygotes sensibles et d'hybrides hétérozygotes (Tab. 4.3).

Tableau 4.3 Relation entre le temps de knockdown en minutes (KdT) et la mortalité pour une souche sensible (Kisumu), une souche résistante (Kou) et leurs hybrides. Intervalles de confiance (95%) entre parenthèses. ND, Non déterminable, moins de 10% de kd après 1 heure d'exposition. N, Nombre de moustiques testés.

Souche	KdT ₅₀ (mn)	KdT ₉₅ (mn)	% Mortalité	N
Perméthrine 0.25%				
Kisumu (SS)	23.3 (22.1-24.4)	42.0 (39.2-45.9)	98.6 %	100
Kisumu x Kou (RS)	40.1 (38.8-41.5)	62.2 (58.3-67.6)	84.0 %	75
Kou (RR)	ND	ND	0 %	100
Perméthrine 1%				
Kisumu (SS)	11.4 (10.9-11.9)	18.2 (16.9-20.4)	100 %	200
95% SS + 5% RS	9.6 (8.4-10.5)	19.1 (17.3-22.1)	99.0 %	80
90% SS + 10% RS	11.6 (10.8-12.2)	19.5 (17.4-23.6)	100 %	80
80% SS + 20% RS	12.0 (11.2-12.7)	21.4 (19.6-24.1)	100 %	80
60% SS + 40% RS	14.4 (13.7-15.2)	26.3 (24.2-29.5)	100 %	79
40% SS + 60% RS	16.6 (15.8-17.4)	29.3 (27.1-32.3)	91.3 %	80
Kisumu x Kou (RS)	20.7 (19.9-21.5)	32.5 (30.7-35.0)	80.0 %	102
Kou (RR)	ND	ND	5.0 %	100

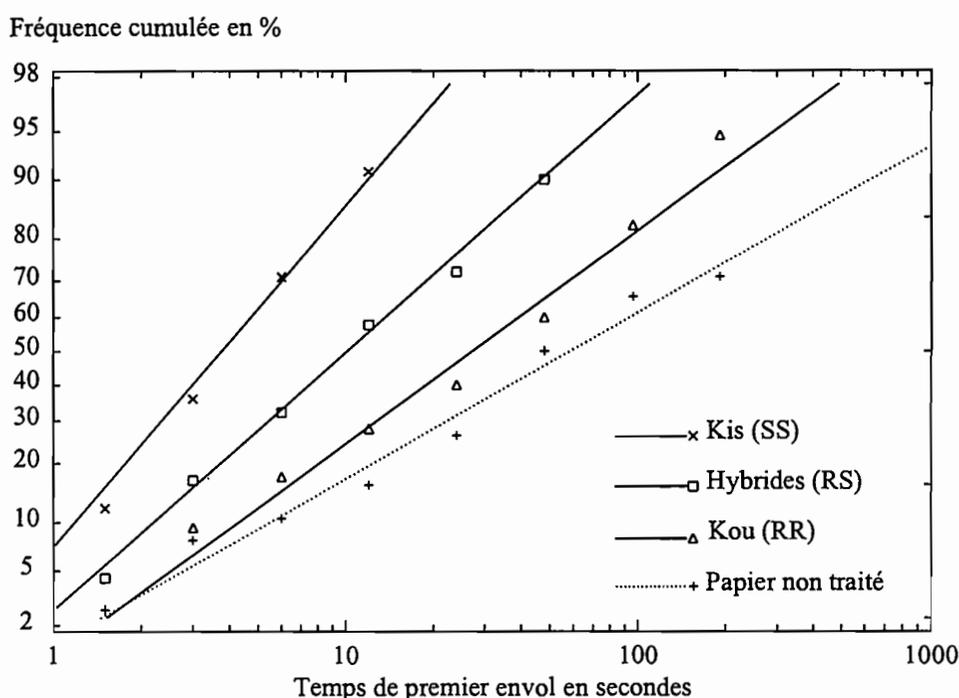
Comme cela est classiquement observé, la forte mortalité des hétérozygotes indique que le gène *kdr* est semi récessif (Bourguet *et al.*, 1997a). Le caractère récessif du gène *kdr* s'explique par le fait qu'une faible proportion de canaux Sodium maintenus en position ouverte suffit à provoquer la paralysie puis la mort. Or, les hétérozygotes possèdent 50% de leur canaux sensibles à l'effet de l'insecticide. De même, les temps de knockdown (KdT) sont à peine doublés chez les hétérozygotes (RS) par rapport aux sensibles (SS) tandis que les homozygotes résistants (RR) sont complètement insensibles. Le faible écart entre les KdT des SS et des RS explique qu'une augmentation significative n'est observée que pour des proportions de RS d'au moins 40%. Toutefois, comme cela était suspecté, elle survient avant qu'un effet significatif sur la mortalité n'intervienne (au moins 60% RS). Ces résultats confirment l'intérêt de la mesure du knockdown dans la détection de la résistance. Il faut noter que les proportions de SS et de RS que nous avons utilisées sont purement théoriques dans la mesure où la proportion maximale de RS dans une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg est de 50% correspondant à 25% de SS et 25% de RR. Le fait que des augmentations plus fortes du KdT₉₅ soient observées sur le terrain résulte probablement de la présence de quelques individus RR complètement insensibles à l'effet knockdown (paragraphe 4.3).

4.6.3. Effet irritant des pyréthrinoides

Bien qu'il ait été très peu étudié, l'effet irritant par contact des pyréthrinoides est un des facteurs essentiels qui conditionne l'efficacité des moustiquaires imprégnées. Plusieurs méthodes ont été proposées pour mesurer l'effet irritant des insecticides et plus particulièrement du DDT. En effet, cet insecticide a été suspecté d'avoir sélectionné chez certains anophèles une "hyperirritabilité" leur conférant ainsi une résistance comportementale par évitement des surfaces traitées (Busvine, 1964). Dans la plupart des cas, il s'agissait en fait d'un comportement naturel exacerbé avec le DDT fortement irritant par rapport aux autres insecticides. Une étude comparative de ces méthodes a montré qu'une d'entre elles, basée sur la mesure du temps de premier envol permettait une interprétation statistique fiable (Mouchet et Cavalie, 1961). Son principe consiste à introduire les moustiques un par un dans un cône OMS posé sur un papier imprégné

d'insecticide ou sur une surface traitée. Après une période d'acclimatation, généralement de 60 secondes, on mesure le temps écoulé entre le moment où l'insecte se pose pour la première fois sur la surface traitée et celui où il s'envole. Les moustiques sont ensuite regroupés par classes de temps d'envol. L'évolution de la fréquence cumulée de ces classes en fonction du temps de premier envol est analysée selon un modèle log-probit (Fig. 4.6).

Figure 4.6. Temps de premier envol en secondes des moustiques de la souche sensible (Kisumu), de la souche résistante (Kou) et de leurs hybrides après contact avec un papier imprégné de perméthrine 1%



Pour la souche sensible Kisumu, le temps de premier envol de 50 % des moustiques est 15 fois plus court avec une surface traitée à la perméthrine 1% qu'avec un support non traité, indiquant que l'insecticide a un effet fortement irritant sur les moustiques. La résistance conférée par le gène *kdr* s'accompagne d'une résistance à l'effet irritant qui se traduit par un contact 7 à 18 fois plus long des moustiques résistants (souche Kou) par rapport aux sensibles (souche Kisumu). Contrairement à la mortalité, les temps de premier envol des hybrides sont intermédiaires à ceux des parents, ce qui indique que la résistance à l'effet irritant est codominante chez les hétérozygotes. Cette différence est vraisemblablement liée aux processus physiologiques mis en jeu. Dans le

cas de la mortalité et de l'effet knockdown c'est le système nerveux moteur qui est impliqué alors que pour l'effet irritant ce sont les chémorécepteurs et le système nerveux sensitif qui interviennent. Cette codominance suggère qu'au moins 50% des récepteurs ou des fibres sensibles doivent être stimulés avant d'entraîner une réaction à l'effet irritant.

4.6.4. Résistance et efficacité des moustiquaires imprégnées

Les résultats précédents montrent que la mutation *kdr* engendre deux effets antagonistes. Elle permet aux individus résistants de tolérer de plus fortes concentrations d'insecticides, mais dans le même temps ceux-ci sont capables de demeurer plus longtemps sur un support imprégné et donc sont susceptibles d'adsorber une quantité plus forte d'insecticide par contact tarsal. Des expériences ont été menées au laboratoire puis sur le terrain dans des cases expérimentales pour tenter d'évaluer les implications pratiques de ces résultats sur le comportement des moustiques et par voie de conséquence sur la protection conférée par les moustiquaires imprégnées.

Les expériences de laboratoire ont été réalisées dans un dispositif en verre inspiré du modèle de Elissa et Curtis (1995). La cage est divisée en deux compartiments séparés par un tulle moustiquaire imprégné d'insecticide et percé de 5 trous. Des femelles à jeun sont placées dans un des compartiments et dans l'autre on introduit un cobaye. Après une nuit, on dénombre les femelles mortes, celles qui sont passées à travers la moustiquaire et celles qui se sont gorgées sur le cobaye (Tab. 4.4).

Tableau 4.4. Effet des moustiquaires imprégnées de perméthrine (250 mg/m²) en cage de verre sur une souche sensible (Kisumu) et deux souches homozygotes résistantes (Tola, Kou) d'*An. gambiae s.s.* N, Nombre de moustiques.

Souche	Moustiquaire	% Mortalité	% Femelles passées	% Femelles gorgées	N
Kisumu	Témoin	16.0	82.0	69.0	200
	Perméthrine	100	10.1	0	214
Tola	Témoin	9.2	83.0	69.5	282
	Perméthrine	58.7	45.8	16.8	310
Kou	Témoin	17.0	75.0	62.8	328
	Perméthrine	81.7	39.9	8.7	389

Les premiers tests réalisés au laboratoire montrent que quelle que soit la souche, 63-69% des femelles sont capables de prendre un repas sanguin après être passées à travers une moustiquaire non traitée. En présence de perméthrine (250 mg/m²), la totalité des individus sensibles sont tués alors que 20-40% des moustiques résistants survivent. La proportion de moustiques qui passent à travers la moustiquaire est plus forte chez les résistants que chez les sensibles confirmant que la mutation *kdr* leur permet de rester plus longtemps au contact du tulle imprégné pour rechercher un accès vers le cobaye. Aucun moustique sensible ne réussit à se gorger contre 9 à 17% pour les résistants.

Après une phase de mise au point au laboratoire, ce test a été validé sur le terrain, à Bouaké (Côte d'Ivoire), en comparant les résultats obtenus en parallèle dans les tunnels et en cases expérimentales. La case expérimentale est constituée d'une pièce unique munie d'un système de chicanes permettant l'entrée des moustiques mais pas leur sortie. La seule possibilité pour les moustiques de sortir de la case est une vaste ouverture donnant dans une "véranda-piège" entourée d'une moustiquaire. Un dispositif de cône permet au moustique de sortir dans la véranda mais l'empêche de retourner dans la pièce. Dans la case, un dormeur couché sous moustiquaire sert d'appât. Cette moustiquaire peut être traitée (case traitée) ou non (case témoin). Dans cette expérience, les orifices d'entrée dans la case ont été obstrués et les moustiques de la souche sensible (Kisumu) ou d'une population locale résistante (Yaokoffikro) ont été lâchés le soir dans

la pièce. Le lendemain on a récolté les femelles et dénombré les mortes et les gorgées (Tab. 4.5).

Tableau 4.5. Effet des moustiquaires imprégnées de perméthrine (500 mg/m²) ou de deltaméthrine (25 mg/m²) en cage de verre et en case expérimentale sur une souche sensible (Kisumu) et une population résistante de terrain (Yaokoffikro) d'*An. gambiae* s.s. N, Nombre de moustiques. *, valeurs significativement différentes dans les cages de verre par rapport aux cases expérimentales ($P < 0.05$)

Pop./Souche	Insecticide	Cage de verre			Case expérimentale		
		% Mortalité	% Gorgées	(N)	% Mortalité	% Gorgées	(N)
Kisumu	Témoin	14.3	60.4*	(265)	6.3	16.7	(126)
	Perméthrine	100*	0.4	(237)	94.6	1.3	(148)
	Deltaméthrine	97.4	3.9	(232)	90.7	0	(107)
Yaokoffikro	Témoin	11.0*	20.2	(291)	4.1	29.2	(247)
	Perméthrine	36.5	6.7	(282)	45.4	8.1	(210)
	Deltaméthrine	46.9	3.5	(289)	53.9	2.5	(198)

A Bouaké, les tests ont été réalisés avec la souche sensible Kisumu et des moustiques issus d'une population naturellement résistante de Yaokoffikro où la fréquence du gène *kdr* est de 94.4% (91.7% RR, 5.5% RS, 2.8% SS). Pour une même population, il n'existe généralement pas de différence significative entre les pourcentages de mortalité et de femelles gorgées obtenus en cage de verre et en case expérimentale, indiquant que le système d'expérimentation développé au laboratoire reflète assez bien ce qui se passe sur le terrain. La souche Kisumu maintenue depuis plusieurs années en insectarium est devenue fortement zoophile ce qui explique le faible taux de femelles gorgées dans la case témoin par rapport au test en cage de verre. Comme dans les expériences précédentes avec les individus sensibles, on observe pour les deux insecticides une forte mortalité (90-100%) et une très faible proportion de femelles gorgées. La mortalité est significativement plus faible chez les résistants mais demeure néanmoins forte dans les cases traitées (45-54%). Même si 2.5 à 8% des femelles prennent un repas sanguin, les moustiquaires imprégnées semblent conserver une bonne part de leur efficacité contre les moustiques résistants.

Ces résultats sont encourageants dans la mesure où ils ont été observés dans une zone où 92% des moustiques sont homozygotes résistants. On peut conclure de ces observations que les moustiquaires imprégnées seront encore plus efficaces contre les hétérozygotes. Dans la mesure où ils sont nettement moins irrités, ils pourront passer un temps plus long au contact des moustiquaires imprégnées et de ce fait recevoir une dose plus forte d'insecticide que les moustiques sensibles. Comme par ailleurs ils sont quasiment sensibles à la mortalité et l'effet knockdown (gène *kdr* récessif), ils seront donc éliminés. Ces résultats suggèrent que l'évolution de la résistance sera ralentie dans les populations faiblement résistantes où le gène *kdr* est présent essentiellement à l'état hétérozygote. C'est une des raisons supplémentaires qui nous incite à penser que les moustiquaires imprégnées ont peu de chance d'induire à elles seules une résistance des moustiques impliquant le gène *kdr*.

4.7. Résistance et formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s.*

Ces travaux sont actuellement en cours et nous ne disposons que de résultats préliminaires. Nous avons choisi de les présenter car leurs conséquences tant au niveau de la lutte que de la génétique évolutive ouvrent d'intéressantes voies de recherches.

Le polymorphisme des inversions chromosomiques est particulièrement complexe chez *An. gambiae s.s.* Dans les populations d'Afrique de l'Ouest, le déficit ou l'absence complète d'hétérozygotes à certaines inversions ont conduit à identifier au moins cinq formes chromosomiques correspondant à des unités panmictiques (Coluzzi, 1984; Favia *et al.*, 1997). Les formes Bissau et Forêt sont adaptées aux zones humides et côtières. Les formes Savane, Mopti et Bamako, souvent sympatriques, sont localisées aux zones de savane. L'existence de ces formes témoigne d'un processus de spéciation en cours d'évolution au sein d'*An. gambiae s.s.* Cette évolution est en partie liée aux modifications environnementales induites par l'homme (Coluzzi, 1984; 1992). Les stades larvaires de la forme Savane, a priori plus ancestrale, vivent dans les collections d'eaux temporaires dépendantes des pluies. Au contraire, les larves de la forme Mopti, plus récente, sont adaptées aux gîtes sub-permanents que représentent les périmètres irrigués agricoles et les rizières. Bien que ces formes soient parfaitement interfécondes

au laboratoire, la différenciation génétique présente dans les populations naturelles suggère l'existence de barrières précopulatoires probablement d'ordre comportementale. Cet isolement reproducteur n'est sans doute pas complet dans la mesure où des hybrides déterminés par cytotaxonomie existent sur le terrain. Les hybrides Mopti-Savane identifiés par cette méthode peuvent atteindre 4% dans les populations d'*An. gambiae s.s.* au Burkina Faso (Robert *et al.*, 1989b). Toutefois, leur fréquence estimée par l'analyse chromosomique a probablement été largement surestimée, car des tests moléculaires plus spécifiques (PCR-RFLP) montrent que la plupart des hybrides naturels peuvent être rattachés à l'une ou l'autre des formes parentales (Favia *et al.*, 1997).

Il est intéressant de noter que les phénomènes d'isolement génétique partiel et leurs implications sur la résistance ont déjà été observés chez d'autres espèces comme les simulies vectrices de l'onchocercose humaine en Afrique de l'Ouest (P. Guillet, comm pers.). Les hybrides entre une espèce de forêt (*Similium sanctipauli*) et une espèce de savane (*S. sirbanum*) sont extrêmement rares dans les populations naturelles ($<10^{-4}$). Toutefois, lorsqu'on a pu étudier les larves issues de pontes individuelles de femelles sauvages on s'est aperçu que la fréquence des croisements hybrides pouvait atteindre jusqu'à 30%. Dans ce cas l'isolement génétique semble se manifester par une contre sélection très forte qui s'exerce sur les larves hybrides. La présence d'hybrides même limitée s'est toutefois traduite par des flux de gènes de résistance aux organophosphorés d'une espèce à l'autre.

La relation entre la différenciation génétique intraspécifique d'*An. gambiae s.s.* et la résistance a été récemment détectée de manière fortuite au cours des enquêtes que nous menons sur la répartition du gène *kdr*. Dans le cadre de ces travaux, des moustiques provenant de différents pays africains sont analysés pour détecter la présence du gène *kdr* et déterminer sa fréquence. Or, plusieurs échantillons des zones de savanes en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso présentaient un déficit voire l'absence complète d'hétérozygotes pour l'allèle *kdr*, en présence d'homozygotes sensibles et résistants. Dans ces échantillons l'identification Mopti-Savane par PCR-PFLP (Favia *et al.*, 1997) parallèlement au test *kdr*, nous a montré qu'on ne trouvait la mutation

résistante que chez les moustiques de la forme Savane. L'absence d'hétérozygotes dans certaines populations résulte de la coexistence d'individus Savane homozygotes pour le gène *kdr* et d'individus Mopti sensibles. Bien que ces résultats préliminaires portent sur des échantillons provenant de 18 localités, soit 444 individus identifiés par PCR-RFLP (336 Savane et 108 Mopti), il est encore trop tôt pour en tirer des conclusions définitives. Toutefois, ils démontrent l'existence de barrières entre les populations naturelles des deux formes du complexe, beaucoup plus fortes que ne le laissent présager les études antérieures basées sur les analyses chromosomiques.

Des études de génétique formelle sont en cours pour étudier l'héritabilité du gène *kdr* dans les différentes formes. Elles sont basées sur des croisements de retour entre les hybrides Mopti-Savane hétérozygotes pour le gène *kdr* avec les formes parentales.

4.8. Conclusion: résistance d'*An. gambiae s.s.* aux pyréthrinoides et implications opérationnelles

Toute résistance aux pyréthrinoides chez les vecteurs du paludisme représente une menace potentielle pour les programmes de lutte basés sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées. Nous avons montré que la résistance aux pyréthrinoides est présente dans les populations d'*An. gambiae s.s.* de plusieurs pays, mais qu'elle reste pour le moment localisée à l'Afrique de l'Ouest.

Après avoir caractérisé au niveau moléculaire le mécanisme impliqué (gène *kdr*), nous nous sommes attachés à étudier son impact sur les principaux effets qui conditionnent l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides. Grâce à cette approche nous avons pu montrer que les moustiquaires imprégnées jouissaient d'une bonne efficacité vis à vis des moustiques résistants. Ce résultat s'explique par les actions antagonistes du gène *kdr*, résistance à l'effet létal et résistance à l'effet irritant des pyréthrinoides. Cette étude ainsi que les données accumulées depuis plusieurs années sur l'utilisation du DDT, puis des pyréthrinoides en santé publique nous amènent également à penser que les moustiquaires imprégnées seules ont peu de chance d'induire une résistance de type *kdr* chez les moustiques.

Les observations préliminaires obtenues tant en laboratoire que sur le terrain indique que selon toute vraisemblance, les moustiquaires imprégnées devraient garder leur efficacité au moins comme outil de protection individuelle. Ils demandent toutefois, maintenant à être confirmés au niveau opérationnel en étudiant leur impact notamment au niveau communautaire sur la transmission du paludisme.

5. Conclusions et perspectives

La résistance aux insecticides est un phénomène évolutif dont l'étude présente à la fois un intérêt scientifique majeur et qui a des implications pratiques immédiates et fortes. Selon Georghiou et Taylor (1976), les facteurs qui conditionnent l'évolution de la résistance dépendent à la fois de la biologie de l'insecte, de la nature des mécanismes impliqués et des aspects opérationnels liés aux traitements. En pratique, les stratégies développées pour contrôler la résistance sont élaborées avant tout au niveau opérationnel avec des succès plus ou moins limités (Leeper *et al.*, 1986). Elles sont basées sur l'utilisation de mélanges d'insecticides ayant des modes d'action différents, l'alternance de différents insecticides dans le temps (rotation d'insecticides) ou dans l'espace (traitements en mosaïques), la mise en place de zones refuges non traitées permettant le maintien d'un pool d'individus sensibles, etc... Toutefois, des recherches doivent être entreprises en amont, orientées vers une meilleure connaissance des autres facteurs, se rapportant à l'insecte et aux mécanismes qui régulent ses populations et conditionnent l'évolution des gènes de résistance. Ces recherches contribueront sans aucun doute à la mise au point de stratégies de lutte permettant de mieux maîtriser les phénomènes de résistance aux insecticides.

Dans le domaine de la lutte antivectorielle, les exemples de gestion réussie de la résistance restent à ce jour fort rares. La plupart des hypothèses relatives à l'évolution de la résistance chez les vecteurs s'appuient sur des modèles théoriques (Curtis *et al.*, 1993) ou des expériences de laboratoire (Prasittisuk et Curtis, 1982). Leur valeur prédictive est d'autant plus limitée qu'elles ne prennent en compte qu'un nombre restreint de

paramètres et n'intègrent généralement pas, ou de façon très fragmentaire, la biologie de l'insecte et la dynamique de ses populations (Guillet *et al.*, 1996). Le seul cas concret de gestion raisonnée de la résistance chez un vecteur de maladies tropicales est celui du programme OMS/OCP de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest, dans lequel une rotation systématique et rapide d'insecticides appartenant à plusieurs familles a permis, dans un premier temps, de bloquer l'évolution de la résistance aux organophosphorés chez les simulies (Kurtak, 1990). Appliquée systématiquement depuis maintenant plus de 12 années consécutives, cette rotation est parfaitement maîtrisée et elle assure le maintien de la résistance aux organophosphorés au dessous d'un seuil auquel ces produits peuvent toujours être utilisés efficacement. En outre, aucune résistance aux insecticides utilisés autres que les organophosphorés n'a été observée dans la zone d'OCP.

En travaillant sur deux espèces de moustiques d'intérêt majeur en santé publique, nous nous sommes attachés à mettre en évidence les mécanismes de résistance impliqués et à étudier certains des facteurs qui permettent de mieux comprendre les situations observées sur le terrain en Afrique de l'Ouest et dans une certaine mesure d'en prévoir l'évolution.

La première partie de nos travaux concerne la résistance de *C. quinquefasciatus* en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso. La présence en Côte d'Ivoire, de plusieurs allèles d'estérases surproduites, et d'une acétylcholinestérase insensible y condamne à plus ou moins brève échéance l'utilisation continue des organophosphorés ainsi que des carbamates dans la lutte contre *C. p. quinquefasciatus*. Toutefois, nous avons montré que même après une sélection intensive au laboratoire, ces mécanismes n'engendrent à eux seuls qu'une faible résistance à certains composés. Leur utilisation pourrait donc être envisagée en alternance avec d'autres insecticides ayant des modes d'actions différents, pour autant que l'évolution de la résistance fasse l'objet d'un suivi régulier.

A partir de souches de terrain ayant été sélectionnées au laboratoire, nous avons montré que les interactions entre les différentes estérases et l'allèle *Ace.1^R* étaient relativement complexes. Elles résultent en partie des différences de fitness associées à

chacun des gènes de résistance et dont l'impact en présence ou non d'insecticide permet, désormais, d'envisager de nouvelles approches méthodologiques en termes de modélisation de l'évolution de la résistance sur le terrain (Lenormand et Raymond, 1998).

L'étude de la répartition de la résistance aux organophosphorés et aux carbamates à l'échelle de deux pays limitrophes a révélé l'existence d'une barrière géographique dans le cas de *Ace.I^R*. Cette barrière se situe au niveau de la ville frontalière située sur le principal axe routier reliant les deux pays. L'une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène serait que la majorité des moustiques transportés depuis la Côte d'Ivoire s'échappent des véhicules ou meurent au cours de leur arrêt prolongé au poste frontière ce qui aurait pour effet de retarder d'autant l'introduction du gène *Ace.I^R* au Burkina Faso.

La résistance de *C. p. quinquefasciatus* aux pyréthrinoides est à la fois forte et relativement homogène sur l'ensemble de la zone d'étude. Ceci résulte probablement de l'usage massif de ces insecticides au niveau domestique (aérosols, tortillons fumigènes...). Deux mécanismes sont impliqués simultanément, le gène *kdr* et les mono-oxygénases à cytochrome P450. Il est à noter qu'au cours de cette étude nous avons mis en évidence un mécanisme spécifique, probablement métabolique (oxydases), qui confère une résistance à la perméthrine mais pas à la deltaméthrine.

Une analyse de la structure des populations de *C. p. quinquefasciatus* nous a permis de préciser les modalités de dispersion des mécanismes de résistance en Afrique de l'Ouest. Au sein d'une même ville les populations ne sont pas différenciées et le très fort brassage génétique qui en résulte explique que les niveaux de résistance ne varient pas d'un quartier à l'autre. A l'échelle de notre zone d'étude, on observe un isolement génétique des populations en fonction de la distance géographique. Toutefois, il existe des flux géniques importants entre des villes proches qui permettent aux gènes de résistance de se disperser largement.

L'étude de la résistance des anophèles aux pyréthrinoides nous a montré que ses implications opérationnelles ne sont pas directement déductibles du seul niveau de résistance mesuré au laboratoire. Elle sont certes liées à des facteurs directs tels que les gènes de résistance, mais également au comportement du vecteur en présence de l'insecticide et à la méthode de lutte employée. Pour avoir une meilleure appréciation des divers effets de la résistance, nous avons régulièrement confronté les données expérimentales obtenues en laboratoire aux observations récoltées en parallèle sur le terrain.

Au départ, nous nous sommes heurtés à un problème méthodologique et avons dû définir des critères fiables pour diagnostiquer la résistance en utilisant le test OMS. Le principe même de ce test n'a pas été remis en cause dans la mesure où il présente de nombreux avantages et qu'il a fait déjà largement ses preuves avec d'autres insecticides. Nous avons simplement déterminé ou réévalué les concentrations diagnostiques de différents pyréthrinoides pour *An. gambiae*, et étudié l'évolution du knockdown au cours de l'exposition à l'insecticide. Au laboratoire comme sur le terrain, le temps de knockdown s'est révélé être un indicateur plus précoce que la mortalité pour détecter l'apparition d'une résistance, du moins lorsque le gène *kdr* y est impliqué.

Par la seule utilisation du test OMS, nous avons confirmé la présence de la résistance d'*An. gambiae* s.s. aux pyréthrinoides et au DDT dans trois pays d'Afrique de l'Ouest, et fortement suspecté l'implication du gène *kdr*. Dans tous les endroits où la résistance a été détectée, les pyréthrinoides n'ont jamais été utilisés en santé publique tandis que le DDT l'a été de façon très focalisée dans les années 55-60. Il a été rapidement abandonné du fait de son incapacité à contrôler totalement la transmission dans les zones de paludisme stable. Ce n'est qu'en 1967 qu'a été détecté en Afrique de l'Ouest le premier cas de résistance au DDT. Cette résistance a fait rapidement suite à l'introduction massive de cet insecticide en agriculture, notamment pour la protection du coton. Ces éléments ont conforté notre suspicion de l'implication du gène *kdr* dans la résistance actuelle aux pyréthrinoides.

L'existence d'un allèle *kdr* a été confirmée avec la mise en évidence d'une mutation sur la cible de ces insecticides, le canal sodium voltage dépendant. Cette mutation est identique et située à la même place que celle retrouvée chez d'autres espèces. Bien qu'elle ne soit pas la seule mutation de type *kdr* décrite chez les insectes, cette similitude observée chez des espèces très différentes suggère non seulement qu'elle est située à un endroit clé de l'interaction entre l'insecticide et son récepteur mais également que les possibilités de changement d'acide aminé compatibles à la fois avec la résistance et la transmission de l'influx nerveux sont sans doute très limitées.

Nous avons utilisé le test diagnostique de la mutation *kdr* (PASA) avec différents échantillons d'*An. gambiae s.s.* collectés en Côte d'Ivoire et pour lesquels des tests OMS avec différents pyréthrinoides et le DDT avaient été pratiqués. L'analyse de la corrélation entre la fréquence du gène *kdr* et la résistance, montre que ce dernier est bien le principal mécanisme impliqué dans la résistance au DDT et à un pseudo pyréthrinocide, l'étofenprox. En revanche, ce n'est pas le cas avec les autres insecticides pour lesquels un autre mécanisme, probablement métabolique semble intervenir également. Ce mécanisme qui n'a pas été identifié pour le moment joue sans doute un rôle très secondaire, du moins dans l'état actuel des choses.

Nous avons tenté de prévoir l'impact que pourrait avoir cette résistance sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides. De fait, la coexistence de deux phénomènes antagonistes montrent que le gène *kdr* n'entraîne pas une diminution de leur efficacité tout au moins comme outil de protection individuelle. D'un côté les moustiques homozygotes résistants ne sont tués qu'à des doses de perméthrine 30 à 40 fois plus fortes que celles qui tuent les individus sensibles. De l'autre côté, les moustiques résistants sont beaucoup plus tolérants à l'effet irritant des pyréthrinoides. Ceci leur permet de demeurer en contact plus longtemps avec la moustiquaire imprégnée pour rechercher un accès vers leur proie, ce qui augmente par là même la quantité d'insecticide qu'ils adsorbent au niveau des tarsi. Les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides conservent de ce fait une bonne efficacité sur le terrain même vis à vis de populations d'*An. gambiae s.s.* constituées à plus de 90% d'individus homozygotes pour le gène *kdr*.

Ces travaux soulèvent un certain nombre de questions qui ouvrent des perspectives de recherches nouvelles pour ce qui concerne à la fois les stratégies de lutte, et la génétique des populations et de la résistance:

- La grande variété des mécanismes de résistance aux organophosphorés dans les populations de *C. quinquefasciatus* implique sans doute que ces populations sont soumises à une pression de sélection relativement importante. Dans aucune des villes étudiées, *C. p. quinquefasciatus* n'a fait l'objet de campagnes de lutte organisées et suivies. En outre, les organophosphorés ne constituent qu'une part minime des insecticides entrant dans la composition des aérosols à usage domestique et ils n'interviennent pas dans les tortillons fumigènes, en Afrique de l'Ouest. Il serait donc intéressant de déterminer si, par exemple, les estérases surproduites ont également un rôle dans la dégradation d'autres molécules toxiques ayant des liaisons esters et qui pourrait induire un certain avantage sélectif même en l'absence d'organophosphorés.
- L'un des éléments les plus préoccupants dans la résistance de *C. quinquefasciatus* concerne les pyréthrinoides. Compte tenu du comportement au moins partiellement ornithophile de cette espèce, il est probable que ses densités ne soient que peu affectées par l'utilisation des pyréthrinoides en milieu urbain notamment dans le cadre de lutte antipaludique. En effet, les femelles momentanément éloignées de l'homme par les moustiquaires imprégnées peuvent maintenir les populations à un niveau stable en se gorgeant sur les oiseaux. Dans un tel contexte, il est donc nécessaire d'évaluer l'impact de la protection individuelle conférée par les moustiquaires imprégnées sur la nuisance engendrée par *C. p. quinquefasciatus*. Mais il est également important de savoir dans quelle mesure l'évolution de cette nuisance peut influencer sur le comportement des utilisateurs potentiels face à cette méthode de lutte (les gens recherchant dans la moustiquaire avant tout une protection contre la nuisance et non contre la maladie).
- L'apparition d'un gène de résistance dans une population résulte soit d'une mutation apparue spontanément puis sélectionnée sur place soit de son introduction par migration puis de sa sélection. Les données accumulées sur le complexe *C. pipiens*

depuis plusieurs années démontrent que ces mutations sont des événements rares. L'extension géographique de la résistance de ce moustique dépend donc avant tout de la migration des individus résistants et de la pression sélective auxquelles ses populations sont soumises (Pasteur et Raymond, 1996).

En est-il de même pour *An. gambiae*? L'utilisation continue du DDT en santé publique pendant plus de 20 ans dans certains pays d'Afrique de l'Est, suivie par celle des pyréthrinoides depuis plusieurs années n'a apparemment jamais sélectionné la mutation *kdr* chez *An. gambiae s.l.* Il n'est donc pas exclu que la présence du gène *kdr* en Afrique de l'Ouest provienne d'une mutation unique qui s'est dispersée par la suite. Ceci mérite d'être étudié et dans cette hypothèse, l'évaluation de l'intensité des flux géniques chez *An. gambiae s.s.* permettrait d'apprécier le risque de dissémination de ce gène en Afrique. Ces recherches auront sans aucun doute un impact opérationnel important sur les stratégies d'utilisation des moustiquaires imprégnées préconisées par l'OMS.

- La nature des flux géniques chez *An. gambiae s.l.* pose également le problème de l'isolement génétique entre les formes ou espèces de ce complexe sur le terrain et notamment des formes Mopti et Savane à l'intérieur du groupe *A. gambiae s.s.* L'avantage sélectif des moustiques de la forme Savane en présence d'insecticide aurait-il des conséquences sur l'équilibre actuel de ces deux formes dans les zones où elles sont en sympatrie? Et si oui, dans quelle mesure cela peut-il influencer sur les paramètres entomologiques de la transmission et la gravité de la maladie?

Des espoirs ont été fondés sur la lutte génétique et sur les possibilités de contrôler le paludisme en Afrique, en introduisant dans les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* des gènes qui les rendraient réfractaires au développement du parasite. La mutation *kdr* qui confère un avantage sélectif immédiat ne semble pas passer facilement d'une forme à l'autre, du moins dans l'état actuel de nos connaissances. Cet isolement génétique pourrait fort bien limiter les possibilités de propagation de ces gènes au sein des populations naturelles.

- Bien que le gène *kdr* ne réduise apparemment pas, du moins de façon sensible, la protection que confère les moustiquaires imprégnées au niveau individuel, il est

possible que les moustiques résistants qui survivent au contact des pyréthrinoides aient une espérance de vie supérieure à celle des sensibles. Dans ce cas le contrôle de la transmission du paludisme risquerait d'être moins bon dans les zones où les anophèles sont résistants. Il est donc essentiel de contrôler l'impact opérationnel de cette résistance sur la réduction de la transmission et de la morbidité palustre.

- Une résistance aux pyréthrinoides due à des oxydases a été récemment observée au Kenya dans une zone où les moustiquaires imprégnées ont été largement utilisées. Au cours de notre étude, il est apparu qu'un mécanisme secondaire probablement de type métabolique était également présent en Côte d'Ivoire. Il y aura donc lieu de déterminer la nature de ce mécanisme et ses interactions éventuelles avec le gène *kdr*.
- Enfin se pose la question importante de savoir quelle est la part de la sélection qui provient d'une part de la santé publique et de l'usage domestique des pyréthrinoides, et d'autre part celle qui résulte de l'agriculture (coton, riz, etc...). En effet, si conformément à notre hypothèse la sélection due à la santé publique est négligeable par rapport à l'agriculture, la marge de manoeuvre dont disposeront les programmes de lutte antipaludique pour mettre en place une stratégie de gestion la résistance sera sans doute très étroite, du moins dans les zones à forte production agricole. Les pyréthrinoides étant malheureusement les seuls insecticides actuellement disponibles pour l'imprégnation des moustiquaires, il est important de rechercher dès à présent des stratégies de lutte alternatives et/ou complémentaires.

Il a été proposé par exemple d'imprégner les moustiquaires avec un mélange de pyréthrinoides et de régulateurs de croissance afin de stériliser les femelles qui échapperaient à l'effet des pyréthrinoides, notamment du fait de leur résistance. Des essais réalisés au laboratoire avec le pyriproxifen seul ont donné des résultats peu convaincants. De plus, abstraction faite des implications financières, l'effet de ces hormones associées à des pyréthrinoides risque d'être d'autant plus faible que l'effet irritant des ces derniers limite le contact du moustique avec la moustiquaire et donc la quantité d'hormones reçues.

L'expérience acquise au cours de plusieurs années de lutte dans les zones de paludisme stable en Afrique, a montré que les échecs observés avec le DDT sont liés

à son effet irritant et à son incapacité à réduire suffisamment, dans certaines zones, les densités de vecteurs. Une fraction de la population repoussée par l'effet irritant du DDT peut continuer à se reproduire en piquant les animaux domestiques. C'est sans doute ce qui explique que dans les rares zones de paludisme stable où il n'y avait pas de bétail, le DDT se soit révélé extrêmement efficace (Sud Cameroun, Liberia). Un phénomène analogue pourrait fort bien être observé avec les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides. Une voie de recherche originale consisterait à compléter l'action des moustiquaires imprégnées qui limitent le contact homme-moustique en traitant le bétail avec un insecticide ayant un mode d'action différent, non répulsif, fortement rémanent, et d'administration simple ("Pour On", "Prémélanges médicamenteux"). Une telle approche pourrait bénéficier des programmes de prophylaxie du bétail contre les tiques ou certaines parasitoses. Elle compléterait l'action des moustiquaires imprégnées en termes de réduction des densités d'anophèles et permettrait éventuellement de limiter la résistance aux pyréthrinoides.

L'étude de l'évolution des gènes de résistance au sein des populations d'un vecteur aussi important qu'*An. gambiae s.l.* mettra en œuvre des recherches de haut niveau, qui seront conduites sur le terrain en Afrique de l'Ouest, en association étroite avec des équipes du Nord. Ces recherches s'intègrent bien dans la démarche scientifique qui sous-tend la création du Centre de Biologie et de Gestion des Populations et justifie pleinement les collaborations inter-instituts. Cette collaboration est d'autant plus légitime qu'il existe, nous l'avons vu, un lien direct et étroit entre l'agriculture (insecticide et résistance: CIRAD, INRA) et les insectes nuisants ou vecteurs de maladies (ORSTOM).

Elle répond dans le même temps à des questions d'une grande importance telles que l'impact de la résistance sur l'efficacité de la lutte antivectorielle, ou celui des activités agricoles sur l'évolution de la résistance chez les moustiques. Ces recherches seront conduites sur le terrain en concertation étroite non seulement avec des organismes comme l'OMS, mais également avec les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme et les services d'Hygiène, afin de les conseiller sur les choix

stratégiques en matière de lutte contre le paludisme et les nuisances culicidiennes. Ce programme de recherches, à travers les équipes et les instituts qui le mèneront à bien, fait partie intégrante du réseau de surveillance de la résistance des moustiques aux insecticides que l'OMS met actuellement en place en Afrique. Cette intégration permettra entre autres de transférer rapidement les techniques nouvelles sur le terrain et de conseiller les états dans la mise en œuvre de stratégies adaptées pour lutter plus efficacement contre les vecteurs du paludisme.

Références

Abderrazak, S.B., F. Guerrini, F. Mathieu-Daudé, P. Truc, K. Neubauer, K. Lewicka, C. Barnabé & M. Tibayrenc. 1993. Isoenzyme Electrophoresis for Parasite Characterization, *In* Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology., Hyde J.E. (ed), Vol. 21. Humana Press Inc., Totowa, NJ: 361-382.

Adam, J.P., J. Hamon & J. Chevalier. 1958. Observations complémentaires sur la résistance aux insecticides chez les moustiques de la région d'Abidjan (Basse Côte-d'Ivoire). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **51**: 662-666.

Alonso, P.L., S.W. Lindsay, J.R.M. Armstrong-Schellenberg, M. Konteh, K. Keita, C. Marshall, A. Phillips, K. Cham & B.M. Greenwood. 1993. A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, West Africa. 5. Design and implementation of the trial. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**: 31-36.

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

Armstrong, J.A., C.D. Ramsdale & V. Ramakrishna. 1958. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* Giles in western Sokoto, northern Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **52**: 247-256.

Baldet, T. 1995. Etude comparative de deux stratégies de lutte contre *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 par *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 dans la ville de Maroua (Nord Cameroun). Thèse Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II: 294 p.

Barbazan, P., T. Baldet, F. Darriet, H. Escaffre, D. Haman Djoda & J.M. Hougard. 1997. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **13**: 263-269.

Barr, A.R. 1982. The *Culex pipiens* complex, *In* Recent development in the genetics of insect disease vectors., Steiner W.W.N., Tabachnick W.J., Rai K.S. & Narang S. (eds). Stipes Publishing Co., Champaign, Illinois: 551-572.

- Beach, R.F., T.K. Ruebush II, J.D. Sexton, P.L. Bright, A.W. Hightower, J.G. Breman, D.L. Mount & A.J. Oloo. 1993. Effectiveness of permethrin-impregnated bed nets and curtains for malaria control in a holoendemic area of Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**: 290-300.
- Besansky, N.J., T. Lehmann, T.G. Fahey, D. Fontenille, L.E.O. Braack, W.A. Hawley & F.H. Collins. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics*, **147**: 1817-1828.
- Binson, G. & J. Doucet. 1956. Lutte anti-moustique à Bouaké (Côte d'Ivoire), étude de la faune. *Méd. Trop.*, **16**: 524-533.
- Bisset, J.A., M.M. Rodriguez, C. Diaz, E. Ortiz, M.C. Marquetti & J. Hemingway. 1990. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Bull. Entomol. Res.*, **80**: 245-250.
- Bogh, C., E.M. Pedersen, D.A. Mukoko & J.H. Ouma. 1998. Permethrin-impregnated bednet effects on resting and feeding behaviour of lymphatic filariasis vector mosquitoes in Kenya. *Med. Vet. Entomol.*, **12**: 52-59.
- Bonning, B.C. & J. Hemingway. 1991. Identification of reduced fitness associated with an insecticide resistance gene in *Culex pipiens* by microtitre plate tests. *Med. Vet. Entomol.*, **5**: 377-379.
- Bossart, J.L. & D.P. Prowell. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Tree*, **13**: 202-206.
- Bourguet, D., M. Raymond, J. Bisset, N. Pasteur & M. Arpagaus. 1996a. Duplication of the *Ace.1* locus in *Culex pipiens* mosquitoes from the Caribbean. *Biochem. Genet.*, **34**: 351-62.
- Bourguet, D., M. Raymond, D. Fournier, C.A. Malcolm, J.P. Toutant & M. Arpagaus. 1996b. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Neurochem.*, **67**: 2115-2123.
- Bourguet, D., T. Lenormand, T. Guillemaud, V. Marcel, D. Fournier & M. Raymond. 1997a. Variation of dominance of newly arisen adaptive genes. *Genetics*, **147**: 1225-34.
- Bourguet, D., A. Roig, J.P. Toutant & M. Arpagaus. 1997b. Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. *Neurochem. Int.*, **31**: 65-72.
- Bourguet, D., D. Fonseca, G. Vourch, M.P. Dubois, F. Chandre, C. Severini & M. Raymond. 1998. The acetylcholinesterase gene *Ace*: a diagnostic marker for the *pipiens* and *quinquefasciatus* forms of the *Culex pipiens* complex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*: (sous presse).
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2**: 123-140.

- Brown, A.W.A. & R. Pal. 1973. Résistance des arthropodes aux insecticides. Série de Monographies. World Health Organisation. Genève, Suisse, **38**: 541 p.
- Brun, A. 1997. Etude de l'expression de cytochromes P-450 et analyse de la résistance au DDT d'une souche de *Drosophila melanogaster*. Thèse Université de Nice-Sophia Antipolis: 222 p.
- Busvine, J.R. 1964. The significance of DDT-Irratibility tests on mosquitos. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **31**: 645-656.
- Carnevale, P., V. Robert, C. Boudin, J.M. Halna, L. Pazart, P. Gazin, A. Richard & J. Mouchet. 1988. La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides au Burkina Faso. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **81**: 832-846.
- Carnevale, P. & J. Mouchet. 1990. Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Méd. Trop.*, **50**: 391-398.
- Chambon, R., P. Lemardeley, F.J. Louis, V. Foumane & J.P. Louis. 1997. Connaissances, perceptions et pratiques des populations face au nuisance culicidiennes: résultats de six enquêtes menées au Cameroun en 1994. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **90**: 364-369.
- Chapman, R.F. 1969. The Insects, structure and function. The English Universities Press Ltd. London, UK: 819 p.
- Chavasse, D.C., J.D. Lines, K. Ichimori, A.R. Majala, N. Minjas & J. Marijani. 1995. Mosquito control in Dar es Salaam. II. Impact of expanded polystyrene beads and pyriproxyfen treatment of breeding sites on *Culex quinquefasciatus* densities. *J. Med. Entomol.*, **9**: 147-154.
- Chavasse, D.C., J.D. Lines & K. Ichimori. 1996. The relationship between mosquito density and mosquito coil sales in Dar es Salaam. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **90**: 493.
- Chevillon, C., R. Eritja, N. Pasteur & M. Raymond. 1995a. Commensalism, adaptation and gene flow: mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in different habitats. *Genet. Res. Camb.*, **66**: 147-157.
- Chevillon, C., N. Pasteur, M. Marquine, D. Heyse & M. Raymond. 1995b. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquitos *Culex pipiens*. *Evolution*, **49**: 997-1007.
- Choi, H.W., J.G. Breman, S.M. Teutsch, S. Liu, A.W. Hightower & J.D. Sexton. 1995. The effectiveness of insecticide-impregnated bed nets in reducing cases of malaria infection: a meta-analysis of published results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**: 377-382.
- Coluzzi, M. 1984. Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **62** (suppl.): 107-113.

- Coluzzi, M. 1992. Malaria vector analysis and control. *Parasitology Today*, **8**: 113-118.
- Coluzzi, M., A. Sabatini, V. Petrarca & M.A. DI Deco. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**: 1979.
- Coosemans, M., A. Smits & P. Roelants. 1998. Intraspecific isozyme polymorphism of *Anopheles gambiae* in relation to environment, behavior, and malaria transmission in southwestern Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**: 70-74.
- Coustau, C. & R.H. French-Constant. 1995. Detection of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations by single-stranded conformational polymorphism analysis. *Pestic. Sci.*, **43**: 267-271.
- Coz, J., G. Davidson, G. Chauvet & J. Hamon. 1968. La résistance des Anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et à Madagascar. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **6**: 207-210.
- Crabtree, M.B., H.M. Savage & B.R. Miller. 1997. Development of a polymerase chain reaction assay for differentiation between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in North America based on genomic differences identified by subtractive hybridization. *J. Med. Entomol.*, **34**: 532-537.
- Cuany, A., J. Handani, J. Bergé, D. Fournier, M. Raymond, G.P. Georghiou & N. Pasteur. 1993. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **45**: 1-6.
- Curtis, C.F. & N. Pasteur. 1981. Organophosphate resistance in vector populations of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, **71**: 153-161.
- Curtis, C.F., N. Hill & S.H. Kasim. 1993. Are there effective resistance management strategies for vectors of human disease? *Biol. J. Linn. Soc.*, **48**: 3-18.
- Curtis, C.F., J. Myamba & T.J. Wilkes. 1996. Comparison of different insecticides and fabrics for anti-mosquito bednets and curtains. *Med. Vet. Entomol.*, **10**: 1-11.
- Darriet, F. 1991. Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyrethrinoides dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia*, **33**: 111-119.
- Darriet, F., N. Tho Vien, V. Robert & P. Carnevale. 1984. Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria. *WHO/VBC/84.899, WHO/MAL/84.1008*: 20 p.
- Darriet, F., V. Robert & P. Carnevale. 1987. Evaluation de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoïdes et un juvénoïde, dans la lutte contre *Culex quinquefasciatus*. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **25**: 119-126.

- Darriet, F., P. Guillet, F. Chandre, R. N'Guessan, J.M.C. Doannio, F. Rivière & P. Carnevale. 1997. Présence et évolution de la résistance aux pyréthrinoides et au DDT chez deux populations d'*Anopheles gambiae* s.s. d'Afrique de l'Ouest. *World Health Organization, WHO/CTD/VBC/97.1001, WHO/MAL/97.1081*: 15 p.
- Davidson, G., H.E. Paterson, M. Coluzzi, G.F. Mason & D.W. Micks. 1964. The *Anopheles gambiae* complex, *In Genetics of Insect Vectors of Disease.*, Wright, J.W. & Pal, R. (eds). Elsevier Publishing Co., Amsterdam, Netherlands: 211-250.
- Devonshire, A.L. & G.D. Moores. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **18**: 235-246.
- Duchon, S., S. Finot, F. Chandre & P. Guillet. 1997. Testing of pyrethroid impregnated papers on adults *Anopheles gambiae* s.s. Mortality, kd rates and search for the diagnostic concentrations. *Technical report ORSTOM/LIN*, **4**: 21 p.
- Elissa, N., J. Mouchet, F. Rivière, J.Y. Meunier & K. Yao. 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, **73**: 291-294.
- Elissa, N. & C.F. Curtis. 1995. Evaluation of different formulations of deltamethrin in comparison with permethrin for impregnation of netting. *Pestic. Sci.*, **44**: 363-367.
- Elliott, M., N.F. Janes & C. Potter. 1978. The future of pyrethroids in insect control. *Annu. Rev. Entomol.*, **23**: 443-469.
- Favia, G., A. della Torre, M. Bagayoko, A. Lanfrancotti, N.F. Sagnon, Y.T. Touré & M. Coluzzi. 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Ins. Mol. Biol.*, **6**: 377-383.
- Feyereisen, R., J.F. Andersen, F.A. Carino, M.B. Cohen & J.F. Koener. 1995. Cytochrome P450 in the House Fly: Structure, Catalytic Activity and Regulation of Expression of CYP6A1 in an Insecticide-Resistant Strain. *Pestic. Sci.*, **43**: 233-239.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press. Cambridge, UK: 333 p.
- Fournier, D., J.M. Bride, C. Mouches, M. Raymond, M. Magnin, J.B. Berge, N. Pasteur & G.P. Georghiou. 1987. Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **27**: 211-217.
- Gammon, D.W. 1980. Pyrethroid resistance in a strain of *Spodoptera littoralis* is correlated with decreased sensitivity of the CNS in vitro. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **13**: 53-62.
- Gammon, D.W., M.A. Brown & J.E. Casida. 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **15**: 181-191.

- Gariou, J. & J. Mouchet. 1961. Apparition d'une souche d'*Anopheles gambiae* résistante à la dieldrine dans la zone de campagne antipaludique du Sud-Cameroun. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **54**: 870-875.
- Georghiou, G.P., R.L. Metcalf & F.E. Gidden. 1966. Carbamate resistance in mosquitoes: selection of *Culex pipiens fatigans* Wied. (= *Culex quinquefasciatus*) for resistance to Baygon. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **35**: 691-708.
- Georghiou, G.P. & C.E. Taylor. 1976. Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon. In Proc. 15th International Congress of Entomology, America. Entomological Society of America (ed). Washington, D.C.: 759-785
- Georghiou, G.P. & N. Pasteur. 1978. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. Econ. Entomol.*, **71**: 201-205.
- Goudet, J., M. Raymond, T. De Meeüs & F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid population. *Genetics*, **144**: 1933-1940.
- Grant, D.F. & F. Matsumura. 1989. Glutathione S-Transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **33**: 132-143.
- Guillemaud, T., S. Rooker, N. Pasteur & M. Raymond. 1996. Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Heredity*, **77**: 535-543.
- Guillemaud, T., T. Lenormand, D. Bourguet, C. Chevillon, M. Raymond & N. Pasteur. 1998. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. *Evolution*: Soumis.
- Guillet, P., F. Chandre & J. Mouchet. 1996. Vector insecticide resistance and limits of prediction. In Proc. 10th European SOVE Meeting. Strasbourg, France: 75-76
- Guo, S.W. & E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**: 361-372.
- Haldane, J.B.S. 1954. An exact test for randomness of mating. *J. Genet.*, **52**: 631-635.
- Halliday, W.R. & G.P. Georghiou. 1985. Cross-resistance and dominance relationships of pyrethroids in a permethrin-selected strain of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.*, **78**: 1227-1232.
- Hamon, J., M. Eyraud, S. Sales & J.P. Adam. 1958. Observations sur le niveau de sensibilité au DDT, au Dieldrin et au HCH de *Culex pipiens* ssp. *fatigans* dans la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta, Afrique Occidentale Française. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **51**: 393-404.
- Hamon, J. & J. Mouchet. 1961. La résistance aux insecticides chez les insectes d'importance médicale: méthodes d'étude et situation en Afrique au Sud du Sahara. *Méd. Trop.*, **21**: 564-596.

- Hamon, J., M. Eyraud, B. Diallo, A. Dyemkouma, H. Bailly-Choumara & S. Ouanou. 1961. Les moustiques de la République du Mali (Dipt. Culicidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, **130**: 95-129.
- Hamon, J. & C. Garrett-Jones. 1963. La résistance aux insecticides chez des vecteurs majeurs du paludisme et son importance opérationnelle. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **28**: 1-24.
- Hamon, J., J. Brengues & B. Dédéwanou. 1963. Compte rendu des prospections entomologiques faites dans les régions de Tiassallé et de Bouaké, République de Côte d'Ivoire, du 3 au 14 août 1963. *Rapport technique OCCGE Bobo-Dioulasso*, **398**: 24 p.
- Hamon, J. & J. Mouchet. 1967. La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **37**: 277-286.
- Hamon, J., G.F. Burnett, J.P. Adam, A. Rickenback & A. Grjebine. 1967. *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, *Wuchereria bancrofti* Cobbold, et le développement économique de l'Afrique tropicale. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **37**: 217-237.
- Hamon, J., R. Subra, S. Sales & J. Coz. 1968. Presence dans le sud-ouest de la Haute-Volta d'une population d'*Anopheles gambiae* ""A"" résistante au DDT. *Wld. Hlth. Org. WHO/VBC/68.75*: 10 p.
- Harbach, R.E., C. Dahl & G.B. White. 1984. *Culex (Culex) molestus* Forskal (Diptera: Culicidae): neotype designation, description, variation and taxonomic status. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, **86**: 521-542.
- Harbach, R.E., C. Dahl & G.B. White. 1985. *Culex (Culex) pipiens* Linnaeus (Diptera: Culicidae): concepts, type designation, and description. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, **87**: 1-24.
- Hartl, D.L. & A.G. Clark. 1989. Principles of population genetics. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass., USA: 682 p.
- Hassal, K.A. 1990. The biochemistry and uses of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. VCH Publ. Inc., New York, USA: 536 p.
- Head, D.J., A.R. McCaffery & A. Callaghan. 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine lepidoptera. *Ins. Mol. Biol.*, **7**: 191-196.
- Hemingway, J. 1980. Modification of the adult resistance test kit to measure knockdown rates. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**: 677.
- Hemingway, J. 1983. Biochemical studies on malathion resistance in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**: 477-480.
- Hemingway, J. 1998. Mosquito carboxylesterase: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.*, **12**: 1-12.

- Karch, S., B. Garin, N. Asidi, Z. Manzambi, J.J. Salaun & J. Mouchet. 1993. Moustiquaires imprégnées contre le paludisme au Zaïre. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, **73**: 37-53.
- Khayrandish, A. & R.J. Wood. 1993. A multiple basis for insecticide resistance in a strain of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Muheza, Tanzania, studied as resistance declined. *Bull. Entomol. Res.*, **83**: 75-86.
- Kurtak, D.C. 1990. Maintenance of effective control of *Simulium damnosum* in the face of insecticide resistance. *Acta Leidensia*, **59**: 95-112.
- Laven, H. 1967. Speciation and evolution in *Culex pipiens*, In *Genetics of Insect Vectors of Disease*, Wright, J.W. & Pal, R. (eds). Elsevier Publishing Co., Amsterdam, Netherlands: 251-275.
- Leeper, J.R., R.T. Roush & H.T. Reynolds. 1986. Preventing or managing resistance in arthropods, In *Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management*, populations, Committee on strategies for the management of pesticide resistance pest populations (ed). National Academy Press, Washington, D.C.: 335-346.
- Lengeler, C., D. De Savigny & J. Cattani. 1997. De la recherche à la mise en oeuvre, In *Un mur contre la malaria: du nouveau dans la prévention des décès dus au paludisme*. CRDI/OMS, Ottawa, Canada: 1-16.
- Lenormand, T. & M. Raymond. 1998. Resistance management: the stable zone strategy. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **265**: (sous presse).
- Lenormand, T., T. Guillemaud, D. Bourguet & M. Raymond. 1998. Evaluating gene flow using selected markers: a case study. *Genetics*, **149**: 1383-1392.
- Lines, J. 1997. Les questions techniques, In *Un mur contre la malaria: du nouveau dans la prévention des décès dus au paludisme*. CRDI/OMS, Ottawa, Canada: 17-59.
- Lund, A.E. & T. Narahashi. 1983. Kinetics of Sodium Channel Modification as the Basis for the Variation in the Nerve Membrane Effects of Pyrethroids and DDT Analogs. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **20**: 203-216.
- Magesa, S.M., O. Aina & C.F. Curtis. 1994. Detection of pyrethroid resistance in *Anopheles* mosquitos. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **72**: 737-740.
- Magnin, M., E. Marboutin & N. Pasteur. 1988. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J. Med. Entomol.*, **25**: 99-104.
- Mahon, R.J., C.A. Green & R.H. Hunt. 1976. Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, **66**: 25-31.
- Majori, G., G. Sabatinelli, F. Villani & V. Petrarca. 1986. Studies on insecticide resistance of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in the area of Ouagadougou, Burkina Faso (West Africa). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2**: 305-309.

- Martinez-Torres, D., A.L. Devonshire & M.S. Williamson. 1997. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of Domain II Sodium channel gene sequences from insects. *Pestic. Sci.*, **51**: 265-270.
- Metcalf, R.L. 1989. Insect Resistance to Insecticides. *Pestic. Sci.*, **26**: 333-358.
- Miles, S.J. 1978. Enzyme variation in the *Anopheles gambiae* Giles group of species (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, **68**: 85-96.
- Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap & F. Matsumura. 1996. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.*, **252**: 61-68.
- Mouchés, C., N. Pasteur, J.B. Bergé, O. Hyrien, M. Raymond, B.R. De Saint Vincent, M. De Silvetri & G.P. Georghiou. 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, **233**: 778-780.
- Mouchet, J. 1988. Agriculture and vector resistance. *Insect Sci. Applic.*, **9**: 297-302.
- Mouchet, J. 1990. Le paludisme, une endémie en expansion dans les pays tropicaux. *Afrique Contemporaine*, **154**: 75-78.
- Mouchet, J. 1994. Le DDT en santé publique. *Cahiers Santé*, **4**: 257-262.
- Mouchet, J. & P. Cavalie. 1961. L'irritabilité vis à vis du DDT d'*Anopheles gambiae* et d'*A. funestus* dans le Nord-Cameroun. *Riv. Malariol.*, **40**: 1-27.
- Mouchet, J., R. Elliot, J. Gariou, J. Voelckel & J. Varrieras. 1960. La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied. et les problèmes d'hygiène urbaine au Cameroun. *Méd. Trop.*, **20**: 447-456.
- Mouchet, J., J. Dejardin & R. Subra. 1968. Sensibilité aux insecticides de *Culex pipiens fatigans* en Afrique de l'Ouest. *Méd. Trop.*, **28**: 374-394.
- Mouchet, J. & P. Guillet. 1985. The motivating factors for community participation in vector control. In 4th Conference on Perception and management of pests and pesticides, Westview Press B.U. (ed). Chiang Mai, Thailand: 109-116
- Mouchet, J., V. Robert, P. Carnevale, C. Ravaonjanahary, M. Coosemans, D. Fontenille & L. Lochouarn. 1991. Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale: place et limite de la lutte antivectorielle. *Cahiers Santé*, **1**: 277-288.
- Mulligan III, F.S. & C.H. Schaefer. 1990. Efficacy of a juvenile hormone mimic, pyriproxyfen (S-31183), for mosquito control in dairy wastewater lagoons. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **6**: 89-92.

- Mutero, A., M. Pralavorio, J.M. Bride & D. Fournier. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5922-5926.
- Park, Y. & M.J.F. Taylor. 1997. A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ins. Biochem. Molec. Biol.*, **27**: 9-13.
- Pasteur, N. 1977. Recherches de génétique chez *Culex pipiens* L. Polymorphisme enzymatique, autogénèse et résistance aux organophosphorés. Thèse Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier: 163 p.
- Pasteur, N., A. Iseki & G.P. Georghiou. 1981. Genetic and biochemical studies of the highly active esterases A' and B associated with organophosphate resistance in mosquitoes of *Culex pipiens* complex. *Biochem. Genet.*, **19**: 909-919.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan & J. Britton-Davidian. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Paris, France: 217 p.
- Pasteur, N., M. Marquine, F. Rousset, A.B. Failloux, C. Chevillon & M. Raymond. 1995. The role of passive migration in the dispersal of resistance genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* within French Polynesia. *Genet. Res. Camb.*, **66**: 139-146.
- Pasteur, N. & M. Raymond. 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration and selection in field populations. *J. Heredity*, **87**: 444-449.
- Pauron, D., J. Barhanin, M. Amichot, M. Pralavorio, J.B. Bergé & M. Lazdunski. 1989. Pyrethroid receptor in the insect NA⁺ channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. *Biochemistry*, **28**: 1673-1677.
- Prapanthadara, L., J. Hemingway & A.J. Ketterman. 1995a. DDT-resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione-S-transferases. *Bull. Entomol. Res.*, **85**: 267-274.
- Prapanthadara, L., J. Hemingway & A.J. Ketterman. 1995b. Partial purification and characterization of Glutathione-S-Transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **47**: 119-133.
- Prasittisuk, C. & C.F. Curtis. 1982. Further studies of DDT resistance in *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) and a cage test of elimination of resistance from a population by male release. *Bull. Entomol. Res.*, **72**: 335-344.
- Priester, T.M. & G.P. Georghiou. 1980. Cross-resistance spectrum in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Pestic. Sci.*, **11**: 617-624.
- Privora, M. 1975. Use of KT 50 for orientative evaluation (screening) of sensitivity of flies to insecticides. *J. Hyg. Epid. Microb. Immun.*, **19**: 184-194.

- Qiao, C.L. & M. Raymond. 1995. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. *Heredity*, **74**: 339-345.
- Raymond, M., B. Gaven, N. Pasteur & G. Sinègre. 1985. Etude de la résistance au chlorpyrifos à partir de quelques souches du moustique *Culex pipiens* L. du sud de la France. *Génét. Sél. Evol.*, **17**: 73-88.
- Raymond, M., D. Fournier, J.M. Bride, A. Cuany, J. Bergé, M. Magnin & N. Pasteur. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *J. Econ. Entomol.*, **79**: 1452-1458.
- Raymond, M., D.G. Heckel & J.G. Scott. 1989. Interactions between pesticide genes: model and experiment. *Genetics*, **123**: 543-551.
- Raymond, M., A. Callaghan, P. Fort & N. Pasteur. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350**: 151-153.
- Raymond, M., E. Poulin, V. Boiroux, E. Dupont & N. Pasteur. 1993. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity*, **70**: 301-307.
- Raymond, M. & M. Marquine. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: The Corsican paradox. *J. Evol. Biol.*, **7**: 315-337.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2); population genetics software for exact tests and eucumenicism. *J. Heredity*, **86**: 248-249.
- Raymond, M. & N. Pasteur. 1996. Evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: The migration hypothesis of amplified esterase genes, *In* Molecular genetics and evolution of pesticide resistance. ACS Symposium Series., Brown, T.M. (ed), Washington, DC: 90-96.
- Rice, W.R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**: 223-225.
- Rivet, Y. 1992. Les populations de *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) vues au travers des gènes de résistance aux insecticides organophosphorés. Thèse Université Claude Bernard, Lyon: 142 p.
- Robert, V., P. Carnevale & J. Mouchet. 1989a. Pyrethroid-impregnated bed nets in the malaria control strategy at community level. *Acta Tropica*, **46**: 267-268.
- Robert, V., V. Petrarca, P. Carnevale, L. Ovazza & M. Coluzzi. 1989b. Analyse cytogénétique du complexe *Anopheles gambiae* dans la région de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, **64**: 290-311.
- Robert, V. & P. Carnevale. 1991. Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou valley, Burkina Faso. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **69**: 735-740.

- Roberts, D.R. & R.G. Andre. 1994. Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50** (suppl.): 21-34.
- Rodhain, F. & C. Perez. 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris, France: 458 p.
- Rooker, S., T. Guillemaud, J.B. Bergé, N. Pasteur & M. Raymond. 1996. Coamplification of esterases A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, **77**: 555-561.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**: 1219-1228.
- Rousset, F. & M. Raymond. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, **140**: 1413-1419.
- Rozendaal, J.A. 1989. Impregnated mosquito nets and curtains for self-protection and vector control. *Trop. Dis. Bull.*, **86**: 41 p.
- Scott, J.A., W.G. Brogdon & 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.
- Scott, J.G. 1996. Cytochrome P450 Monooxygenase-Mediated Resistance to Insecticides. *J. Pestic. Sci.*, **21**: 241-245.
- Service, M.W. 1966. The replacement of *Culex nebulosus* Theo. by *Culex pipiens fatigans* Wied. (Diptera, Culicidae) in towns in Nigeria. *Bull. Entomol. Res.*, **56**: 407-415.
- Severini, C., R. Romi, M. Marinucci & M. Raymond. 1993. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **9**: 164-168.
- Severini, C., F. Silvestrini, P. Mancini, G. La Rosa & M. Marinucci. 1996. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Ins. Mol. Biol.*, **5**: 181-186.
- Shidrawi, G.R. 1990. Le programme mondial OMS de surveillance de la résistance aux insecticides. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **68**: 537-543.
- Shidrawi, B. & P. Beales. 1998. Turning Malaria Around. *WHO/CTD/MAL/98.6*: 24 p.
- Sinègre, G., M. Babinot, G. Vigo & J.L. Jullien. 1993. *Bacillus sphaericus* et démoustication urbaine. Bilan de cinq années d'utilisation expérimentale de la spécialité Spherimos dans le sud de la France. Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen, **62**: 21 p.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, **39**: 53-65.

- Soderlund, D.M. & J.R. Bloomquist. 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance, *In Pesticide resistance in arthropods.*, Roush, R.T. & Tabashnik, B.E. (eds). Chapman and Hall, New York: 58-96.
- Subra, R. 1970. Etudes écologiques sur *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828 (Diptera: Culicidae) dans une zone urbaine de savane soudanienne Ouest-Africaine. Lieux de repos des adultes. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **8**: 353-376.
- Subra, R. 1972. Etudes écologiques sur *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828 (Diptera: Culicidae) dans une zone urbaine de savane soudanienne Ouest-Africaine. Tendance endo-exophage et cycle d'agressivité. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **10**: 335-345.
- Subra, R. 1973. Etudes écologiques sur *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828 (Diptera: Culicidae) dans une zone urbaine de savane soudanienne Ouest-Africaine. Dynamique des populations imaginales. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **11**: 79-100.
- Subra, R. 1981. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) with special reference to Africa. *Insect Sci. Applic.*, **1**: 319-338.
- Subra, R., S. Sales & B. Bouchite. 1968. Spectres de sensibilité aux insecticides des populations de *C. p. fatigans* en Afrique occidentale et évaluation de larvicides sur le terrain. *8è conf. techn. OCCGE, Bamako*: 7 p.
- Touré, Y.T. 1982. Etude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **20**: 125-131.
- Touré, Y.T. 1984. Sensibilité d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides dans la zone du barrage de Sélingué. *Parassitologia*, **26**: 311-318.
- Urbanelli, S., F. Villani & L. Bullini. 1985. Electrophoretic studies on *Culex quinquefasciatus* Say from Africa: genetic variability and divergence fom *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, **75**: 291-304.
- Urbanelli, S., F. Silvestrini, G. Sabatinelli, F. Raveloarifera, V. Petrarca & L. Bullini. 1995. Characterization of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in Madagascar. *J. Med. Entomol.*, **32**: 778-786.
- Villani, F., G.B. White, C.F. Curtis & S.J. Miles. 1983. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, **73**: 153-170.
- Villani, F. & J. Hemingway. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, **27**: 218-228.

- Weerasooriya, M.V., C.S. Munasinghe, M.P.S. Mudalige, C.F. Curtis & W.A. Samarawickrema. 1996. Comparative efficacy of house curtains impregnated with permethrin, lambda-cyhalothrin or bendiocarb against the vector of bancroftian filariasis, *Culex quinquefasciatus*, in Matara, Sri Lanka. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **90**: 103-104.
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.
- White, G.B. 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**: 278-298.
- WHO. 1970. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Dix-septième rapport du comité OMS d'experts des Insecticides. *Technical Report Series*, **443**: 306 p.
- WHO. 1992. Résistance des vecteurs aux pesticides. Quinzième rapport du comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle. *Technical Report Series*, **818**: 68 p.
- WHO. 1995. Vector control for malaria and other vector-borne diseases. *Technical Report Series*, **857**: 91 p.
- WHO. 1998. Evaluation de la santé, *In* Rapport sur la Santé dans le Monde. La vie au 21e siècle, une perspective pour tous., World Health Organisation (ed), Genève, Suisse: 43-65.
- Williamson, M.S., D. Martinez-Torres, C.A. Hick, N. Castells & A.L. Devonshire. 1996a. Analysis of Sodium Channel Gene Sequences in Pyrethroid-Resistant Houseflies, *In* Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance, Brown, T.M. (ed), Vol. 645: ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC: 52-61.
- Williamson, M.S., D. Martinez-Torres, C.A. Hick & A.L. Devonshire. 1996b. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.*, **252**: 51-60.
- Wirth, M.C., M. Marquine, G.P. Georghiou & N. Pasteur. 1990. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in organophosphate resistance and linkage. *J. Med. Entomol.*, **27**: 202-206.
- Yébakima, A., M. Raymond, M. Marquine & N. Pasteur. 1995a. Resistance to organophosphorous insecticides in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Martinique. *J. Med. Entomol.*, **32**: 77-82.
- Yébakima, A., M.M. Yp-Tcha, P. Reiter, J. Bisset, B. Delay, C. Chevillon & N. Pasteur. 1995b. Detoxifying esterases in *Culex pipiens quinquefasciatus* from the Caribbean-countries. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **11**: 363-366.

Article 1

Guillet P., Chandre F., Mouchet J. 1997. L'utilisation des insecticides en santé publique: états et perspectives. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 27: 552-557.

L'utilisation des insecticides en santé publique : état et perspectives*

P. GUILLET**, F. CHANDRE** et J. MOUCHET***

RESUME La lutte insecticide est un outil essentiel de la prévention contre les maladies à vecteurs et de contrôle des insectes nuisibles. C'est même dans certains cas le seul disponible. Des progrès significatifs ont été faits dans la mise au point de méthodes de lutte plus sélectives et impliquant directement les communautés : moustiquaires et pièges imprégnés de pyréthrinoides pour lutter contre les vecteurs du paludisme et de la maladie du sommeil en Afrique. Ces méthodes s'intègrent bien dans la politique décentralisée des soins de santé primaire développée par l'OMS. Les pyréthrinoides étant de plus en plus utilisés en santé publique, le risque de développement d'une résistance chez les vecteurs doit être sérieusement pris en compte et la recherche de produits alternatifs doit être encouragée.

Mots-clés : Maladies à vecteurs - Insecticides - Résistance - Méthodes de lutte - Santé publique.

LUTTE INSECTICIDE : UN OUTIL DE PRÉVENTION CONTRE LES MALADIES À VECTEURS

La lutte antivectorielle au moyen d'insecticides reste le seul moyen de prévention de masse utilisable contre la plupart des endémies tropicales transmises par des arthropodes (paludisme, dengue, maladie de Chagas, trypanosomiase humaine africaine, filarioses, leishmanioses...). Le vaccin contre la fièvre jaune reste un cas unique (mis à part celui très spécifique de l'encéphalite japonaise). Le vaccin contre la dengue n'est toujours pas au point, pas plus que celui contre le paludisme en dépit de la publicité médiatique qui a accompagné certains essais. La chimioprophylaxie du paludisme est réservée à quelques groupes à risque : femmes enceintes et migrants "officiels", touristes et militaires. La lutte antivectorielle reste de fait le seul moyen d'éviter la contamination des autochtones par le paludisme. Elle prend de ce fait une importance toute particulière devant le développement des résistances aux médicaments. En revanche, pour l'onchocercose, l'ivermectine a pris le relais de la lutte antivectorielle ; appliquée en campagnes de masse, elle protège des manifestations cliniques de la maladie. Pour certaines maladies comme la dengue et la maladie de Chagas, il n'existe aucun moyen curatif et la lutte antivectorielle est la seule arme utilisable. A côté du domaine strictement médical, les insecti-

cides constituent le principal recours des hygiénistes dans la lutte contre les insectes nuisants (moustiques, mouches, punaises, poux, blattes..).

MÉTHODES D'APPLICATIONS DES INSECTICIDES

Bien que bénéficiant d'une mauvaise image de marque, les insecticides restent l'arme la plus utilisée même si les méthodes écologiques, biologiques voire génétiques ont obtenu localement et dans des cas très spécifiques quelques succès. Présentées comme des techniques propres, elles peuvent néanmoins avoir, tout comme les insecticides, des effets nocifs sur l'environnement. Par exemple, la destruction des galeries forestières en Afrique pour lutter contre les glosines ou l'assèchement des marais en Europe ont été considérés comme des désastres écologiques.

La sélectivité des insecticides, intrinsèquement faible, dépend de la façon dont ils sont appliqués. Dans les pulvérisations intradomiciliaires, les insecticides sont adsorbés sur les murs et ne diffusent pratiquement pas dans l'environnement. Ainsi le DDT, bien que banni par les écologistes, est toujours utilisé contre les vecteurs du paludisme et des leishmanioses (1). L'utilisation relativement récente des matériaux imprégnés de pyréthrinoides (moustiquaires, rideaux..) permet de réduire considérablement les quantités d'insecticides utilisées (2-4). A l'avenir, l'application des insecticides devra être de plus en plus sélective tout en restant efficace. Cette sélectivité ne peut être obtenue qu'avec une bonne connaissance de l'écologie des insectes cibles, de la transmission des agents patho-

* 6^e Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur de Paris, 30 mai 1997.

** LIN ORSTOM, BP 5045, F-34032 Montpellier Cedex 1.

*** ORSTOM, 213 rue La Fayette, F-75010 Paris Cedex 10.

gènes qu'ils véhiculent et des propriétés des insecticides formulés. On n'a pas enregistré de progrès spectaculaires dans le domaine de la formulation des insecticides utilisés en santé publique. Des préparations aqueuses moins toxiques et moins irritantes pour la peau que celles à base de solvants organiques ont été récemment développées pour imprégner les moustiquaires. Les peintures insecticides demandent des compléments d'évaluation, notamment contre les vecteurs de la maladie de Chagas en Amérique du Sud. Les diffuseurs thermiques (plaquettes, tortillons) sont très utilisés en hygiène domestique dans le monde entier mais leur impact au niveau médical est encore mal connu. De nouveaux diffuseurs d'insecticides liquides assurent désormais une protection de plusieurs semaines.

LES INSECTICIDES

La revue publiée par l'OMS (5) sur les méthodes chimiques de lutte contre les vecteurs est en cours de réédition. Parmi les organo-chlorés, seul le DDT est encore utilisé pour la lutte antipaludique (pulvérisations intradomiciliaires). Il est progressivement abandonné au profit des pyréthrinoides.

Parmi les quelques 400 organo-phosphorés existants, seuls une dizaine sont utilisés en santé publique. Le fénitrothion, à la fois adulticide et larvicide, a été très employé mais tend à être remplacé comme larvicide par le téméphos (Abate®). Ce dernier, peu toxique pour la faune non cible, est le produit de choix pour la lutte contre les larves de simuliés et de moustiques vivant dans les eaux claires. Dans les eaux polluées, le chlorpyrifos (Dursban®) est efficace mais les moustiques cibles (*Culex sp.*) ont presque partout développé une résistance. Le malathion est encore largement utilisé contre les moustiques adultes (pulvérisations intradomiciliaires et spatiales) malgré son odeur désagréable.

Les carbamates tels que le bendiocarbe et le carbosulfan, bien que très efficaces, sont d'usage restreint du fait de leur toxicité élevée et de leur coût. Par contre, le propoxur (Baygon®) parfois utilisé contre les vecteurs du paludisme (6), est très implanté sur le marché des insecticides domestiques. Le carbosulfan, efficace à la fois comme larvicide et comme adulticide, pourrait constituer une alternative aux pyréthrinoides pour l'imprégnation des rideaux. L'efficacité de cette technique demande à être confirmée.

Les pyréthrinoides de synthèse, dérivés des pyréthrines naturelles, sont massivement utilisés en santé publique (7). On distingue les composés à faible rémanence mais à fort effet knock-down (resméthrine, bioresméthrine, esbiothrine, d-phénothrine ...) présents dans les aérosols, tortillons et plaquettes à usage domestique et utilisés également dans les programmes spécifiques de lutte contre les mouches synanthropiques. Les pyréthrinoides stables, avec la perméthrine d'une part et le groupe des α -cyano pyréthrinoides d'autre part (deltaméthrine, lambdacyhalothrine, alphaméthrine, cyfluthrine...) sont les plus utilisés, notamment pour les traitements intradomiciliaires et l'imprégnation de pièges, écrans,

rideaux et moustiquaires (8, 9). Il existe quelques produits dérivés comme l'étofenprox (pseudo-pyréthrinoides) qui a un mode d'action similaire, une efficacité comparable à celle de la perméthrine mais une toxicité encore plus faible.

De nombreux insecticides inhibiteurs du développement sont disponibles. Très efficaces contre les larves, ces produits sont encore peu utilisés. La raison principale tient au fait qu'ils n'agissent qu'au moment des mues larvaires (ecdysoides) ou de la nymphose (juvénoïdes) qui suivent le traitement. Ainsi, pour contrôler les traitements dans le cadre des opérations de désinsectisation, il faut ramener des larves au laboratoire et attendre selon le cas, la mue ou la nymphose. Si un échec est constaté, il est en général trop tard pour intervenir sur le terrain. Jusqu'ici, leur emploi est limité à la destruction des moustiques en Amérique du Nord. Des résultats intéressants ont été obtenus en utilisant ces produits comme chimiostérilisants des insectes adultes, par exemple le pyriproxifen contre les glossines (10).

Les bactéries entomopathogènes (*Bacillus thuringiensis israelensis* (B.t.i.) et *Bacillus sphaericus*) sont efficaces contre les larves de moustiques et de simuliés (11-13). La première contient plusieurs toxines ayant des modes d'action différents. Elle est efficace contre toutes les espèces. En Afrique de l'Ouest, dans le cadre du Programme de lutte contre l'onchocercose (OCP), 40 à 60 % des traitements larvicides sont faits avec le B.t.i. Il en est de même pour la totalité des traitements anti-simulidiens en Amérique du Nord. *B. sphaericus* ne contient qu'une seule toxine binaire active sur les larves de *Culex* et, à un moindre degré, sur celles d'anophèles et de quelques autres moustiques. Contrairement au B.t.i., il est efficace en eaux polluées et de ce fait utilisé surtout contre les larves du moustique urbain *Culex pipiens* et sa sous-espèce tropicale *Cx p. quinquefasciatus*. Ces deux bactéries sont remarquablement sélectives et préservent l'entomofaune associée aux espèces cibles. En revanche, les formulations sont peu rémanentes du fait de la dégradation des toxines par les rayons solaires et de leur sédimentation dans le milieu, hors de la zone de nutrition des larves. Les recherches en cours devraient permettre d'en améliorer significativement la rémanence.

LES INSECTES CIBLES

Les vecteurs du paludisme constituent l'une des principales cibles de la lutte antivectorielle, même si celle-ci est largement sous-employée. Les traitements intradomiciliaires avec des insecticides rémanents (pyréthrinoides et, dans une moindre mesure, organophosphorés et DDT) gardent toute leur efficacité dans les zones de paludisme instable et en situation épidémique (14, 15). Sur les plateaux de Madagascar, la prévalence du parasite a diminué de 80 % après un seul cycle de traitement au DDT et de 90 % après le deuxième cycle (16). Ce type de traitement demande toutefois une structure opérationnelle verticale, difficilement compatible avec la décentralisation des soins de santé, base de la politique horizontaliste de l'OMS. L'utilisation par les populations de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides est la

principale alternative aux traitements intradomiciliaires (17). Basée sur la participation communautaire, elle suppose une acceptation sociale du sommeil sous moustiquaire, la disponibilité des moustiquaires à un prix abordable et la possibilité de les réimprégner après chaque lavage ou, du moins, régulièrement. Les différentes méthodes de lutte antilarvaire ou de réduction des sources n'ont donné des résultats épidémiologiquement tangibles que dans de rares situations, très localisées.

En l'absence de vaccin, la lutte contre les vecteurs de dengue, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, est d'actualité. La destruction de leurs gîtes larvaires est théoriquement simple mais difficile à réaliser car elle passe par une participation active des communautés. Or, la nuisance engendrée par ces moustiques étant en général faible, les habitants sont peu motivés pour y participer. Le traitement exhaustif des gîtes au téméphos ou même au *B.t.i.* est difficile du fait de la multiplicité des rejets domestiques, surtout dans les zones périurbaines au développement souvent anarchique. A ces difficultés se rajoute la méconnaissance du seuil de densité des populations vectorielles en deça duquel une épidémie ne peut se déclarer. On ignore même si la lutte antilarvaire de fond, en période interépidémique, permet d'empêcher ou de retarder le déclenchement des processus épidémiques. En début d'épidémie, les pulvérisations spatiales non rémanentes dirigées contre les insectes adultes sont efficaces. Pour ce faire, on utilise de plus en plus les pyréthrinoides. Des incertitudes demeurent quant au choix de l'intervalle entre les traitements. Rapprochés (trois traitements successifs à trois jours d'intervalle), ils ont donné d'excellents résultats au Vietnam (18). Dans le cadre des maladies re-émergentes, la récente épidémie urbaine de virus West Nile en Roumanie (Bucarest, 1996) ouvre d'autres perspectives de lutte antivectorielle, cette fois-ci contre *Culex pipiens*.

C. pipiens et sa sous-espèce tropicale *Cx. p. quinquefasciatus*, même s'ils ne sont que rarement vecteurs (filariose lymphatique, arboviroses) sont responsables d'intolérables nuisances en milieu urbain et ont développé des résistances à la plupart des insecticides utilisables y compris à la toxine du *B. sphaericus* (19, 20). Bien que l'utilisation des larvicides fasse partie intégrante de la lutte contre les *Culex*, l'hygiène au sens large et l'assainissement urbain en constituent la part de loin la plus importante et malheureusement, la plus négligée dans les villes tropicales. La filariose de Bancroft ne fait généralement pas l'objet d'une lutte antivectorielle spécifique même si elle peut bénéficier dans certains cas des traitements contre le paludisme quand leurs vecteurs (anophèles) sont communs. Bien que cette maladie puisse atteindre localement des niveaux d'endémicité relativement élevés (Tanzanie, Inde, Pakistan...), elle régresse spontanément avec le développement socio-économique (Réunion, Maurice...). Dans le cas de l'onchocercose ou cécité des rivières, la lutte antivectorielle a longtemps été la seule intervention possible. Depuis les années 1990, un nouveau médicament, l'ivermectine, est disponible et utilisable en campagne de masse. En dehors du programme OCP qui continue à employer des larvicides en

association avec l'ivermectine (21), deux vastes programmes de lutte ont été lancés, l'un en Afrique et l'autre dans les Amériques (Centrale et du Sud), basés entièrement sur la distribution de masse de l'ivermectine (22). Des essais sont en cours pour l'utilisation éventuelle de ce médicament contre les filarioses lymphatiques.

La lutte contre les vecteurs de la maladie de Chagas a été dynamisée dans les pays du Cône Sud de l'Amérique (Brésil, Argentine, Chili, Uruguay, Paraguay et Bolivie) dans le cadre d'un vaste programme inter-états (23). Les maisons situées dans les zones d'endémies sont toutes traitées une fois à l'aide de pyréthrinoides rémanents. Elles ne sont retraitées qu'en cas de réinfestations par les triatomés, l'alerte étant donnée par les populations elles-mêmes. Des résultats déjà très substantiels ont été obtenus en Argentine et au Brésil. A l'avenir, ce programme devrait s'étendre plus au Nord jusqu'au Mexique. L'élimination de la maladie de Chagas constitue un objectif ambitieux mais réaliste compte tenu des résultats déjà obtenus. La trypanosomiase humaine africaine est une maladie en recrudescence, notamment en Afrique Centrale (Angola, Congo, Zaïre) et Orientale (Ouganda, Soudan). Le dépistage et le traitement des malades se heurtent à plusieurs difficultés parmi lesquelles l'indifférence des pouvoirs publics, la dégradation des structures sanitaires périphériques et la lourdeur du traitement médical. La lutte contre les glossines par utilisation de pièges et écrans imprégnés de pyréthrinoides a connu en revanche un vif succès tant au niveau pilote (Côte d'Ivoire, Congo) (24) qu'au niveau opérationnel (Ouganda) (25). Compte tenu des risques minimes de résistance chez les glossines, on dispose désormais d'excellents outils de lutte (pyréthrinoides stables, notamment la deltaméthrine, pièges et écrans). Le développement d'opérations de grande envergure passe par une volonté politique des états concernés qui ont du mal à s'affirmer autrement que par des déclarations. Des traitements aériens ont permis de débarrasser de vastes zones du sud de l'Afrique des tsétsés du groupe *morsitans*, vectrices des trypanosomoses du bétail. Les résultats ont été spectaculaires pour le développement de l'élevage, au Zimbabwe notamment, mais l'impact écologique de ces pratiques est très discuté.

Parmi les nombreuses formes de leishmanioses, deux peuvent faire l'objet d'une lutte insecticide car leurs vecteurs sont endophiles. C'est le cas notamment du kala-azar indien qui avait disparu pendant la campagne d'éradication du paludisme ; il est réapparu avec son arrêt en 1975. La leishmaniose cutanée anthroponotique urbaine (Turquie, Asie centrale et intérieure) est également une excellente cible pour la lutte antivectorielle. Des essais récents avec des moustiquaires et des écrans imprégnés de pyréthrinoides ou même des pulvérisations spatiales à l'extérieur dans les lieux de repos des phlébotomes ont donné des résultats encourageants laissant entrevoir la possibilité de mettre en oeuvre des programmes de lutte antivectorielle. Certaines formes de leishmanioses zoonotiques restent pour le moment hors du champ de la lutte antivectorielle.

Les puces ne posent plus de sérieux problèmes de santé publique à l'exception de quelques foyers de peste en Asie du Sud-Est, à Madagascar et en Afrique de l'Est. En milieu urbain, le contrôle des rats par appâts empoisonnés doit aller de pair avec celui des puces, faute de quoi celles-ci quittent les rats morts et passent sur l'homme, aggravant ainsi la transmission. Les insecticides sont utilisés en poudrage au sol ou en association avec des appâts empoisonnés pour les rongeurs. Ils agissent par contact ou par voie systémique, après ingestion de l'insecticide par le rat. La lutte contre les puces de rats se heurte souvent, comme à Madagascar, à de sérieux problèmes de résistance, notamment aux pyréthrinoides (26). La lutte contre les poux a connu une période "faste" avec l'utilisation des pyréthrinoides et notamment de la perméthrine. Le développement d'une résistance à ce produit en Europe a conduit les fabricants à proposer des associations contenant à la fois un pyréthrinocide et un organophosphoré (souvent le malathion) ou parfois un inhibiteur du développement (méthoprène). En Afrique, les poux sont généralement sensibles aux pyréthrinoides et résistants au malathion. Des campagnes de poudrage systématique avec de la perméthrine ont été réalisées au Zaïre et au Burundi pour limiter les risques d'épidémies de typhus dans les camps de réfugiés.

Dans le domaine de l'hygiène publique, la lutte contre les mouches synanthropiques (dont la mouche domestique) est encore largement basée sur l'utilisation des insecticides. Bien que l'arsenal de produits existants soit très diversifié, le développement de la résistance a nettement réduit leur champ d'application. On tend de plus en plus à utiliser des insecticides non rémanents tels que les pyréthrines ou à faire des applications très sélectives de produits rémanents (organophosphorés, régulateurs de croissance, ou même nouvelles familles d'insecticides). Cette sélectivité permet de respecter les ennemis naturels qui jouent un rôle important dans la régulation des populations.

Dans le cadre de l'hygiène domestique, la lutte contre les blattes, les termites ou même les acariens des poussières passe presque toujours par l'utilisation d'insecticides et d'acaricides. Ces applications, en général à la charge des habitants, permettent d'utiliser des produits onéreux et des techniques assez sophistiquées. La lutte contre les blattes reste le plus gros marché d'insecticides en santé publique et fait vivre quantité de petites entreprises de désinsectisation, en général très sérieuses.

PERSPECTIVES

Nombreux sont les exemples dans lesquels l'utilisation des insecticides en santé publique a donné des résultats excellents. Cela a été le cas pour la lutte antipaludique, en dehors des zones d'endémie stable en Afrique. Son abandon progressif dans les années 70, par lassitude des donateurs et des pays concernés, s'est traduit par une recrudescence spectaculaire de la maladie qui tend à réoccuper les territoires d'où elle avait été délogée de 1950 à 1975 et ceci se traduit par des épi-

démies meurtrières comme à Madagascar ou au Swaziland. Le programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest basé sur l'utilisation de larvicides anti-simulidiens, a permis d'éliminer la maladie à l'échelle de pays entiers. On peut citer également la sérieuse réduction de la maladie de Chagas en Amérique du Sud ou l'élimination du kala-azar en Indes pendant la campagne antipaludique au DDT. Malgré cela, la lutte antivectorielle est de nos jours sous-employée ou mal employée. Plusieurs causes concourent à cette situation. Elle demande une certaine technicité, facile à développer dans les grands programmes spécialisés, mais pratiquement inexistante au niveau périphérique et dans les systèmes de soins de santé primaire. La tendance de l'OMS et des grands bailleurs de fonds en matière de santé publique est à la décentralisation et les programmes verticaux engendrent souvent une certaine défiance en dépit de leur efficacité. La difficulté dans laquelle se trouvent certains pays à pratiquer la lutte antivectorielle les a amenés à supprimer celle-ci de facto. Seule une attitude pragmatique qui consisterait à adapter les structures et les moyens aux objectifs et non pas le contraire permettrait de sortir de l'impasse (27).

Depuis 1985, un effort a été fait pour produire des outils de lutte efficaces utilisables au niveau des communautés. Ce sont d'abord les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides qui offrent une bonne protection contre le paludisme et certaines leishmanioses. Ce sont également les pièges et écrans à glossines également imprégnés de pyréthrinoides. Leur utilisation en Ouganda a permis de juguler en trois ans l'épidémie de Busoga grâce à la collaboration entre une structure d'état verticale et les communautés locales. Ces deux exemples ouvrent la voie à des approches novatrices dans l'emploi des insecticides en santé publique. Il faut cependant garder en mémoire que ces méthodes doivent être simples pour être applicables au niveau périphérique et qu'elles doivent apporter un bénéfice immédiatement perceptible pour recueillir l'adhésion des populations.

Hors du domaine des insecticides, les recherches actuelles en matière de lutte antivectorielle s'orientent sur la transgénèse qui suscite autant d'espoirs que de réserve. Rendre un insecte réfractaire au développement d'un parasite par clonage de gènes est techniquement faisable. Des inconnues majeures demeurent quant à l'éventuel pouvoir vecteur de ces insectes transgéniques vis-à-vis d'autres agents pathogènes, voire même d'agents non encore identifiés à ce jour. Des problèmes éthiques similaires à ceux rencontrés avec les plantes transgéniques en agriculture se poseront donc, mais avec une plus grande acuité s'agissant de vecteurs de maladies. Enfin, le remplacement durable des populations sauvages d'insectes vecteurs par des souches non vectrices posera des problèmes tels qu'on peut difficilement évaluer les chances de succès de telles méthodes. En outre, les populations comprendraient difficilement qu'on relâche des moustiques qui les piquent au lieu de les tuer.

L'arsenal des insecticides utilisables en santé publique est encore bien fourni même si les résistances croisées,

fréquentes au sein d'une même famille d'insecticides, ont limité, dans certaines situations, l'éventail des produits utilisables. Par exemple, en cas de résistance aux pyréthrinoides chez les anophèles vecteurs du paludisme, on ne disposerait actuellement d'aucun insecticide de remplacement pour imprégner les moustiquaires et une composante majeure de la lutte antipaludique serait alors sérieusement menacée. Les recherches en cours permettent de mieux connaître les mécanismes de résistance et de les mettre en évidence, grâce notamment, aux progrès de la biologie moléculaire. On est en revanche beaucoup moins avancés dans la mise au point de stratégies d'utilisation des insecticides permettant de retarder l'apparition de la résistance ou d'en limiter son extension géographique.

Il convient toutefois de rester prudent quant à l'avenir. En effet, du fait des coûts de développement devenus exorbitants, les compagnies agrochimiques investissent de moins en

moins dans le développement d'insecticides nouveaux. En outre, ils sont destinés avant tout à l'agriculture qui offre des marchés infiniment plus rémunérateurs que la santé publique. Par ailleurs chez l'insecte, le nombre de cibles biologiques potentielles pour les insecticides n'est pas extensible à l'infini. La résistance aux pyréthrinoides lorsqu'elle est due au gène *kdr*, héritée en général de l'utilisation passée du DDT, concerne malheureusement tous les insecticides de cette famille. Certains insecticides nouveaux, comme les phénylpyrazoles ont des cibles très voisines de celles de cyclodiènes tels que la dieldrine pour lesquels la résistance, chez les vecteurs, est encore extrêmement répandue. Enfin, l'industrie tend aussi à privilégier le développement d'insecticides sélectifs et peu rémanents (problèmes de résidus) dont le Spinosad®, (nouveau produit commercial à base d'une toxine obtenue par fermentation d'un actinomycète, champignon du sol) est un bon exemple.

SUMMARY

Insecticide control is an essential tool in the prevention of vector born diseases and pest control. In some cases, it is the only tool available (dengue, Chagas disease). Significant progress has been made in the development of new and more selective control methods, based on community participation. They are better in tune with the decentralized policy of primary health care promoted by WHO. Pyrethroids are more and more used for public health and agriculture as well, thus the risk for resistance development in vectors should be seriously taken into account and the search for alternative insecticides encouraged.

Key-words: Vector born diseases - Insecticides - Resistance - Control methods - Public health.

THE USE OF INSECTICIDES IN PUBLIC HEALTH: PRESENT STATUS AND PROSPECTS

REFERENCES

1. MOUCHET J. - Le DDT en santé publique. Cahiers Santé. 1994 ; 4 : 257-62.
2. CARNEVALE P., ROBERT V., BOUDIN C., HALNA J. M., PAZART L., GAZIN P., RICHARD A., MOUCHET J. - La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides au Burkina Faso. Bull Soc Path exo. 1988 ; 81 : 832-46.
3. BERMEJO A., VEEKEN H. - Insecticide-impregnated bednets for malaria control: a review of the field trials. Bull OMS. 1992 ; 70 : 293-6.
4. CHOI H. W., BREMAN J.G., TEUTSCH S. M., LIU S., HIGHTOWER A.W., SEXTON J.D. - The effectiveness of insecticide-impregnated bednets in reducing cases of malaria infection: a meta-analysis of published results. Am J Trop Med Hyg. 1995 ; 52 : 377-82.
5. OMS - Méthodes chimiques de lutte contre les arthropodes vecteurs et nuisibles importants en santé publique. OMS Genève, 1988 : 119 pp.
6. MOLINEAUX L., SHIDRAWI G.R., CLARKE J.L., BOULZAGUET R., ASKAR T., DIETZ K. - The impact of propoxur on *Anopheles gambiae* s.l. and some other anopheline populations, and its relationships with pre-spraying variables. Bull OMS. 1976 ; 54 : 379-89.
7. ZERBA E. - Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. Parasitol Today. 1988 ; 4 : 53-7.
8. HOSSAIN M. I., CURTIS C. F. - Assays of permethrin-impregnated fabrics and bioassays with mosquitoes (*Diptera* : *Culicidae*). Bull Ent Res. 1989 ; 79 : 299-308.
9. CARNEVALE P., COOSEMANS M. - Some operational aspects of the use of personal protection methods against malaria at individual and community level. Ann Soc Belge Méd Trop. 1995 ; 75 : 81-103.
10. LANGLEY P., HARGROVE J.W., MAUCHAMP B., ROYER C., OUCHI H. - Prospects for using pyriproxifen-treated targets for tsetse control. Ent Exp Applic. 1993 ; 66 : 153-9.
11. MULLA M. S. - Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. 1990 ; 134-60. In : «Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies», de Barjac H. et Sutherland D. J. éditeurs, Rutgers University Press, New Brunswick.
12. GUILLET P., KURTAK D.C., PHILIPPON B., MEYER R. - Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for onchocerciasis control in West Africa. 1990 ; 187-201. In : «Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies», de Barjac H. et Sutherland D. J. éditeurs, Rutgers University Press, New Brunswick.
13. HOUGARD J. M. - Formulations and persistence of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larval sites in tropical Africa. 1990 ; 295-306. In : «Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies», de Barjac H. et Sutherland D. J. éditeurs, Rutgers University Press, New Brunswick.
14. MOUCHET J., ROBERT V., CARNEVALE P., RAVONJANAHARI C., COOSEMANS M., FONTENILLE D., LOCHOUARN L. - Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale : place et limite de la lutte antivectorielle. Cahiers Santé. 1991 ; 1 : 277-88.
15. COOSEMANS M., CARNEVALE P. - Malaria vector control : a critical review on chemical methods and insecticides. Ann Soc Belge Méd Trop. 1995 ; 75 : 13-31.

16. RANDRIANTSIMANIRY D. - Lutte antivectorielle dans l'épidémie de paludisme des plateaux de Madagascar. Cahiers Santé. 1995 ; 5 : 392-7.
17. LENGELER C., CATTANI J., DE SAVIGNY D. - Net gain: a new method for preventing malaria deaths. OMS, Genève, 1996 : 189 pp.
18. TANG AM N., LIEU T.X., LE QUY RIEC, CHIEN B.D., LONG N.T. - Utilisation de la K-Othrine ULV 10 et de l'Abate dans la lutte contre *Aedes aegypti* vecteur de la dengue hémorragique à Ho Chi Minh-Ville. Cahiers Santé. 1992 ; 2 : 253-9.
19. CHANDRE F., DARRIET F., DOANNIO J.C., RIVIERE F., PASTEUR N., GUILLET P. - Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from West Africa. J Med Entomol. 1997 ; accepté.
20. NIELSEN LEROUX C., PASQUIER F., CHARLES J.F., SINEGRE G., GAVEN B., PASTEUR N. - Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* mosquito larvae (Diptera : Culicidae). J Med Entomol. 1997 ; 34 : 321-7.
21. MOLYNEUX D. - Onchocerciasis control in West Africa: current status and future of the Onchocerciasis Control Programme. Parasitol Today. 1995 ; 11 : 399-402.
22. REMME H. - The African Programme for onchocerciasis control: preparing to launch. Parasitol Today. 1995 ; 11 : 403-6.
23. SCHUMIS G.A., ZICKER F., MONCAYO A. - Interruption of the Chagas disease transmission through vector elimination. Lancet. 1996 : 348 : 1171.
24. LAVESSIERE C., GOUTEUX J.P., COURET D. - Essais de méthodes de lutte contre les glossines en zone préforestière de Côte d'Ivoire : note de synthèse. Cah. ORSTOM Sér. Ent Méd Parasitol. 1986 ; 18 : 323-8.
25. LANCIEN J. - La lutte contre la maladie du sommeil dans le Sud-Est Ouganda par piégeage des glossines. Ann Soc Belg. Méd Trop. 1991 ; 71 (suppl 1) : 35-47.
26. FONTENILLE D., COULANGE P. - Note sur la sensibilité des puces *Xenopsylla cheopis* de la région d'Antananarivo à la deltaméthrine et au propoxur. Arch Inst Pasteur Madagascar. 1987 ; 1 : 209-12.
27. MOUCHET J., COOSEMANS M. - Quelles structures pour une lutte antivectorielle ? Ann Soc Belg Méd Trop. 1991 ; 71 (suppl 1) : 259 - 66.



Article 2

Chandre F., Darriet F., Doannio J.M.C, Rivière F., Pasteur N., Guillet P.
1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *Journal of Medical Entomology*. 34: 664-671.

Distribution of Organophosphate and Carbamate Resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa

FABRICE CHANDRE, FRÉDÉRIC DARRIET,¹ JULIEN M. C. DOANNIO,¹ FRANÇOIS RIVIÈRE,¹
NICOLE PASTEUR,² AND PIERRE GUILLET

ORSTOM Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France

J. Med. Entomol. 34(6): 664-671 (1997)

ABSTRACT The distribution of organophosphate and carbamate resistance was investigated in 33 samples of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say from 25 cities in Côte d'Ivoire and Burkina Faso. Organophosphate resistance levels were higher in Côte d'Ivoire than in Burkina Faso. Chlorpyrifos resistance ratios at LC₉₅ ranged from 4 to 30 times in Côte d'Ivoire and from 3 to 6 times in Burkina Faso. For temephos, ratios ranged from 3 to 18 and from 1 to 2, respectively. Of 27 samples from Côte d'Ivoire, 25 also displayed cross resistance to carbamates as shown by a mortality plateau in bioassays with propoxur and carbosulfan (similar to chlorpyrifos). Cross resistance to organophosphates and carbamates was caused by an insensitive acetylcholinesterase allele (*Ace^R*). This gene was absent from Burkina Faso, except in Niangoloko near the Côte d'Ivoire border. Organophosphate resistance also was associated with the presence of A2-B2 overproduced esterases which had higher frequencies in Côte d'Ivoire (75-100%) than in Burkina Faso (40-50%). Two other esterases with the same electrophoretic mobility as C2 from Puerto Rico and B1 from California were identified for the 1st time in West Africa. "C2" was widespread, whereas "B1" was present in only a few mosquitoes from Côte d'Ivoire. These differences in resistance patterns should be taken into consideration in planning urban mosquito control strategies within 2 countries.

KEY WORDS *Culex pipiens quinquefasciatus*, West Africa, resistance, organophosphate, carbamate

IN AFRICA, STRONG insecticide selection pressure by urban pest control in the 1950s was followed rapidly by the emergence of resistant populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say in treated areas. In West Africa, resistance to organochlorine insecticides was recorded in 1958 in Côte d'Ivoire and Burkina Faso (Adam et al. 1958, Hamon et al. 1958) and subsequently in Mali (Hamon et al. 1961). In 1968, all *Cx. p. quinquefasciatus* samples from 7 West African countries were resistant to dieldrin and most to DDT (Mouchet et al. 1968). However, these populations were still susceptible to a wide range of organophosphorous compounds. Organophosphate resistance was described a few years after these insecticides had replaced DDT and dieldrin, but it initially was restricted to small foci. In 1963, diazinon and malathion resistance was reported in Freetown (Sierra Leone), but populations reverted to normal susceptibility within 3 mo after the end of treatments (Thomas and Mouchet in Hamon and Mouchet 1967). In 1968, larval susceptibility of 6 samples from Liberia, Côte d'Ivoire, and Benin was

tested with 8 organophosphates; only 1 population (Parakou, Benin) showed resistance to diazinon but not to the other organophosphates, including temephos and chlorpyrifos (Subra et al. 1968). During the 1970s, cases of organophosphate resistance in *Cx. p. quinquefasciatus* populations rapidly increased throughout the world (e.g., Brown 1986). In strains from West Africa (Liberia), East Africa, and Asia, chlorpyrifos resistance was associated with the presence of 2 esterases with high activity (Curtis and Pasteur 1981, Villani et al. 1983). These esterases also were found in California populations and were designated as A2 and B2 (Raymond et al. 1987). A2-B2 esterases were responsible for a low level of organophosphate resistance in Ouagadougou (Burkina Faso) (Majori et al. 1986) and Bouaké (Côte d'Ivoire) (Magnin et al. 1988).

The current survey updates information on the status of organophosphate and carbamate resistance in *Cx. p. quinquefasciatus* from West Africa, thereby helping to plan urban mosquito control. Investigations were performed in major cities from 2 neighboring countries (Côte d'Ivoire and Burkina Faso), and covered a wide range of biogeographic areas to assess how resistance is distributed and to understand the modes of dispersal of resistance genes among populations.

¹ OCCGE, Institut Pierre Richet, BP 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire.

² CNRS UMR 5554. Laboratoire de Génétique et Environnement, Institut des Sciences de l'Environnement, Université de Montpellier II (CC 065), 34095 Montpellier, France.

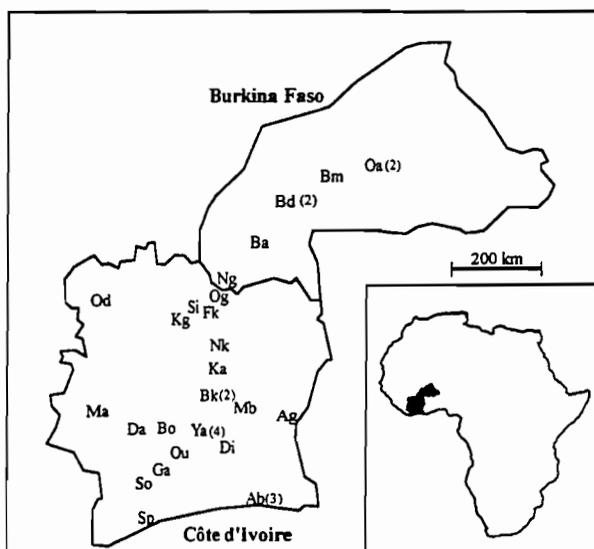


Fig. 1. Locations of the 25 towns surveyed. Numbers of multiple samples are indicated in parentheses. Abbreviations: Côte d'Ivoire: Ab, Abidjan; Ag, Abengourou; Bk, Bouaké; Bo, Bouaflé; Da, Daloa; Di, Dimbokro; Fk, Ferkessédougou; Ga, Gagnoa; Ka, Katiola; Kg, Korhogo; Ma, Man; Mb, M'bahikro; Nk, Niakaramandougou; Od, Odienné; Og, Ouangolo; Ou, Oumé; Si, Sinématiali; So, Soubrié; Sp, San Pédro; Ya, Yamoussoukro. Burkina Faso: Ba, Banfora; Bd, Bobo-Dioulasso; Bm, Boromo; Ng, Niangoloko; Oa, Ouagadougou.

Materials and Methods

Mosquitoes. To avoid mortality and possible changes in genetic composition, samples of *Cx. p. quinquefasciatus* were collected as egg rafts in breeding sites (such as polluted drains, septic tanks, and pit latrines) and transported to the laboratory on wet cotton in petri dishes maintained at 4–10°C. Egg rafts and hatched larvae were transferred to distilled water and supplied with baker's yeast. After 24 h, larvae were fed ad libitum with ground pet croquettes. Larval rearing was done at 26–31°C and a photoperiod of 24:00 (L:D) h, and density was kept at 150–200 larvae per liter of water. Part of each sample was reared to the adult stage and stored in liquid nitrogen for biochemical assays and electrophoretic studies.

Mosquitoes were collected along various transects, the main one followed the road which runs from Côte d'Ivoire to Burkina Faso (950 km from Abidjan to Ouagadougou). From March 1994 to June 1995, 33 samples were collected in 20 representative towns in Côte d'Ivoire and 5 in Burkina Faso (Fig. 1). In the largest towns, multiple collections were made to compare resistance pattern among districts.

Field samples were compared to S-Lab, a susceptible reference strain (Georghiou et al. 1966) reared and tested under the same conditions.

Larval Bioassays. Four insecticides of technical grade quality were used: 2 organophosphates, chlorpyrifos-ethyl (99.8%) and temephos (96.5%) [both provided by Agrevo, Berkhamsted, UK]; and two

carbamates, propoxur (99.4%) [Bayer, Leverkusen, Germany] and carbosulfan (88.1%) [FMC, Philadelphia, PA]. Insecticide solutions were made in 95% ethanol and stored at 4°C for 2 mo.

Bioassays were performed on late 3rd and early 4th instars (usually 4 d after hatching). Sets of 20 larvae were assayed in 99 ml of distilled water, to which 1 ml of insecticide solution at the required concentration was added. Five replicates of 20 larvae per concentration, and 5–9 concentrations providing between 0 and 100% mortality were used for each bioassay. Mortality was recorded after a 24-h exposure. Controls were made with 1 ml of ethanol and mortality never exceeded 4%. Temperature was maintained at 27±1°C during bioassays. Samples were tested with chlorpyrifos, propoxur, and, when possible, with temephos and carbosulfan.

Biochemical Assays. Overproduced Esterases. Esterases of high activity were investigated on single adults using electrophoresis on cellulose acetate plates (HELENA system) as described in Abderazak et al. (1993) using L buffer (Tris-maleate-EDTA, pH 7.4). Gels were soaked in dilute electrophoresis buffer (1/8) and run at 200 V for 23 min. Staining procedure was adapted from Pasteur et al. (1988) for starch gels. Gels were incubated (1–2 min.) with 10 mg of α - and β -naphthyl acetate in phosphate buffer (pH 6.5). Bands were stained with 10 mg of Fast Garnett GBC. Electrophoretic patterns of field mosquitoes were compared with reference strains with known esterases: Tem-R strain (Georghiou et al. 1980) for B1 esterase, Puerto for C2 (Yébakima et al. 1995), Barriol for A1 (Chevillon et al. 1995), SeLax for A2–B2 (Wirth et al. 1990), and Cyprus for A5–B5 (Poirié et al. 1992).

Acetylcholinesterase (AChE). AChE genotypes were investigated on single adults using a microplate assay (Raymond and Marquine 1994). Because insensitive AChE (*Ace^R*) causes high resistance to carbamates, genotypes were identified by the difference of AChE activity in the presence or absence of propoxur. The inhibition curves of AChE activities in the presence of propoxur first were established with reference strains from Côte d'Ivoire to determine the concentration providing the best discrimination between genotypes (unpublished data). The final concentration of propoxur was 0.02 mM.

Data Analysis. Mortality data were analyzed using log dose-probit mortality software developed by Raymond et al. (1993) based on Finney (1971). In addition to probit regression analysis, this program allows the comparison of probit lines by testing parallelism of slopes, and provides confidence limits of resistance ratios. In many bioassays, mortality data were not linear, but rather displayed a plateau. In this case, values for lethal concentrations were estimated graphically after plotting on log-probit paper. Frequencies of resistant individuals were compared using chi-squared contingency tables. When multiple tests were made, the level of signif-

Table 1. Resistance ratios observed at LC₅₀ (RR₅₀) and LC₉₅ (RR₉₅) of *Cx. p. quinquefasciatus* from Côte d'Ivoire and Burkina Faso with chlorpyrifos and propoxur

Towns ^a	Chlorpyrifos ethyl				Propoxur			
	RR ₅₀ ^b	CI ₉₅ ^c	RR ₉₅ ^b	CI ₉₅ ^c	RR ₅₀ ^b	CI ₉₅ ^c	RR ₉₅ ^b	CI ₉₅ ^c
Côte d'Ivoire								
Kg	14*	—	30	—	4.0*	—	>40	—
Bo	12*	—	>23	—	3.3*	—	>400	—
Da	9.4*	—	>18	—	4.1*	—	>400	—
Ya1	14*	—	>23	—	>710*	—	>400	—
Ya2	5.7*	—	>18	—	2.9*	—	>400	—
Ya3	10*	—	>18	—	>710*	—	>400	—
Ya4	5.6*	—	>18	—	2.9*	—	>400	—
Ga	2.1*	—	21	—	2.4*	—	>400	—
So	2.5*	—	>23	—	1.9*	—	>400	—
Si	1.7*	—	23	—	1.4*	—	>40	—
Og	6.1*	—	>23	—	2.1*	—	>400	—
Ag	3.4*	—	>18	—	1.2*	—	>400	—
Sp	3.1*	—	>23	—	1.9*	—	>400	—
Nk	4.6*	—	>23	—	2.2*	—	>400	—
Ma	2.2*	—	9	—	<1.4*	—	>400	—
Ou	1.9*	—	16	—	<1.4*	—	>400	—
Fk	1.7*	—	11	—	1.9*	—	>40	—
Mb	2.1*	—	16	—	<1.4*	—	>400	—
Bk1	6.0*	—	12	—	2.1*	—	>400	—
Bk2	4.1*	—	14	—	2.7*	—	>400	—
Ab1	5.0*	—	8	—	2.1*	—	2.8	—
Ab2	7.5*	—	>27	—	2.3*	—	>400	—
Ab3	2.7*	—	4.5	—	2.0*	—	3.2	—
Ka	2.4*	—	4.0	—	1.4*	—	1.9	—
Di	2.0	1.5-2.7	4.0	2.4-5.6	1.2	1.0-1.6	1.3	0.8-2.1
Od	4.6	3.0-7.1	5.5	2.4-14.3	3.0	2.3-4.0	2.8	1.6-4.6
Burkina Faso								
Ng	2.1*	—	4.5	—	1.5*	—	1.7	—
Ba	1.5	1.1-2.1	2.8	1.9-4.4	0.93	0.7-1.3	1.8	0.9-2.1
Bd1	1.8	1.3-2.4	3.3	2.0-4.6	1.3	0.9-1.8	1.6	1.0-2.4
Bd2	1.4	1.0-1.9	3.3	2.0-4.6	1.1	0.7-1.7	1.3	0.8-1.9
Bm	1.6	1.3-2.2	3.7	2.5-5.4	1.3	1.0-1.6	1.3	0.9-2.0
Oa1	1.5	1.2-2.1	3.4	2.2-5.2	1.5	1.2-1.9	1.4	0.9-2.1
Oa2	2.5	1.9-3.3	5.9	3.8-9.0	0.86	0.6-1.2	1.4	0.9-2.1

LC₅₀ and LC₉₅ in mg/liter for the susceptible reference strain S-Lab were 0.0016 and 0.0022 with chlorpyrifos and 0.14 and 0.25 with propoxur, respectively. *, Rejection of linearity of dose-mortality response ($P < 0.05$).

^a See Fig. 1 for explanation of these symbols.

^b Resistance ratios (LC₅₀₍₉₅₎ sample tested/LC₅₀₍₉₅₎ of S-Lab).

^c 95% CI of RR₅₀ and RR₉₅.

ificance of each test was adjusted to take into account other simultaneous tests (Rice 1989).

Results

Côte d'Ivoire. All samples tested were resistant to organophosphates when compared with the susceptible reference strain S-Lab (Tables 1 and 2). Resistance ratios (RRs) were higher with chlorpyrifos than with temephos. At LC₅₀, RRs ranged from 1.7 to 14 times for chlorpyrifos and from 2.2 to 5.7 times for temephos. At LC₉₅, RRs were higher and ranged from 4 to 30 and 3.3 to 18 times, respectively. Most populations also were highly resistant to carbamates, with RR₉₅ >400 times for propoxur and >145 times for carbosulfan. Most log dose-probit mortality relationships with chlorpyrifos, propoxur, and carbosulfan deviated significantly from linearity (Tables 1 and 2). These curves usually displayed a plateau of mortality, implying polymorphism for a major gene affecting resistance. The frequency of

the resistant phenotypes was estimated from the mortality observed at the plateau (Fig. 2). In all except 4 samples, the level of the plateau did not differ significantly for chlorpyrifos, propoxur, and carbosulfan. These results strongly indicated that the same mechanism was involved in cross-resistance among the 3 insecticides and that this mechanism was most likely an insensitive AChE. In only 2 samples (Di, Od) were mortality curves with chlorpyrifos and propoxur well fitted by a straight line. These samples appeared homogeneous, and their low resistance ratios to propoxur indicated that the resistance mechanism(s) to both insecticides was absent or at very low frequency.

All log dose-probit mortality relationships with temephos were consistent with straight lines (Table 2), although a plateau seemed to be present in a few populations.

Burkina Faso. Most samples showed lower resistance ratios to organophosphates and carbamates than in Côte d'Ivoire (Tables 1 and 2). A mortality

Table 2. Resistance ratios observed at LC₅₀ (RR₅₀) and LC₉₅ (RR₉₅) of *Cx. p. quinquefasciatus* from Côte d'Ivoire and Burkina Faso with temephos and carbosulfan

Towns	Temephos				Carbosulfan			
	RR ₅₀	CI ₉₅	RR ₉₅	CI ₉₅	RR ₅₀	CI ₉₅	RR ₉₅	CI ₉₅
Côte d'Ivoire								
Kg	4.0	3.3-5.0	10.9	7.4-16.7	>310*	—	>145	—
Bo	5.7	4.8-7.1	18.3	11.5-28.7	2.5*	—	>145	—
Da	5.3	4.4-6.6	8.7	5.5-13.3	2.3*	—	>145	—
Ga	3.1	2.6-3.9	12.2	7.2-20.4	—	—	—	—
Sp	3.1	2.5-3.9	6.1	4.2-9.3	1.7*	—	>145	—
Ma	2.9	2.3-3.7	4.3	3.0-6.6	1.6*	—	>145	—
Bk1	3.3	2.8-4.1	6.1	4.0-8.9	2.0*	—	>145	—
Bk2	3.3	2.7-4.1	5.2	3.6-7.6	2.1*	—	>145	—
Ab1	3.1	1.5-6.5	4.2	1.7-10.8	2.0*	—	>145	—
Ab2	2.2	1.8-2.8	3.4	2.4-4.9	2.1*	—	>145	—
Ab3	4.1	3.4-5.1	5.7	3.9-8.3	1.0*	—	1.3	—
Ka	2.3	1.9-3.0	3.3	2.2-4.9	1.3*	—	1.2	—
Od	3.3	2.7-4.2	4.0	2.7-5.9	—	—	—	—
Burkina Faso								
Bd1	1.5	1.3-1.9	2.0	1.3-3.1	0.91	0.65-1.27	0.82	0.36-1.87
Oa1	0.73	0.57-0.94	1.0	0.7-1.5	0.77	0.55-1.09	0.70	0.30-1.61

LC₅₀ and LC₉₅ in mg/liter for the susceptible reference strain S-Lab were 0.0015 and 0.0023 with temephos and 0.0032 and 0.0069 with carbosulfan, respectively. See Table 1 for footnotes.

plateau was observed with chlorpyrifos and propoxur at a level 96% in a single sample (Ng), collected close to the Côte d'Ivoire border (Fig. 1). All other samples were homogeneous in their response to organophosphates and carbamates. The hypothesis of parallelism with S-Lab was always rejected for both organophosphates, and most RRs at LC₉₅ were significantly >1, ranging from 3.3 to 5.9

times for chlorpyrifos and from 1 to 2 times for temephos. Therefore, populations were slightly resistant to organophosphates, and all but Ng populations were fully susceptible to carbamates (Probit lines parallel to S-Lab and resistance ratios close to 1).

Comparison of Resistance Levels Among Different Populations Within Towns. Multiple samples were collected in 3 towns in Côte d'Ivoire (Ab, Bk,

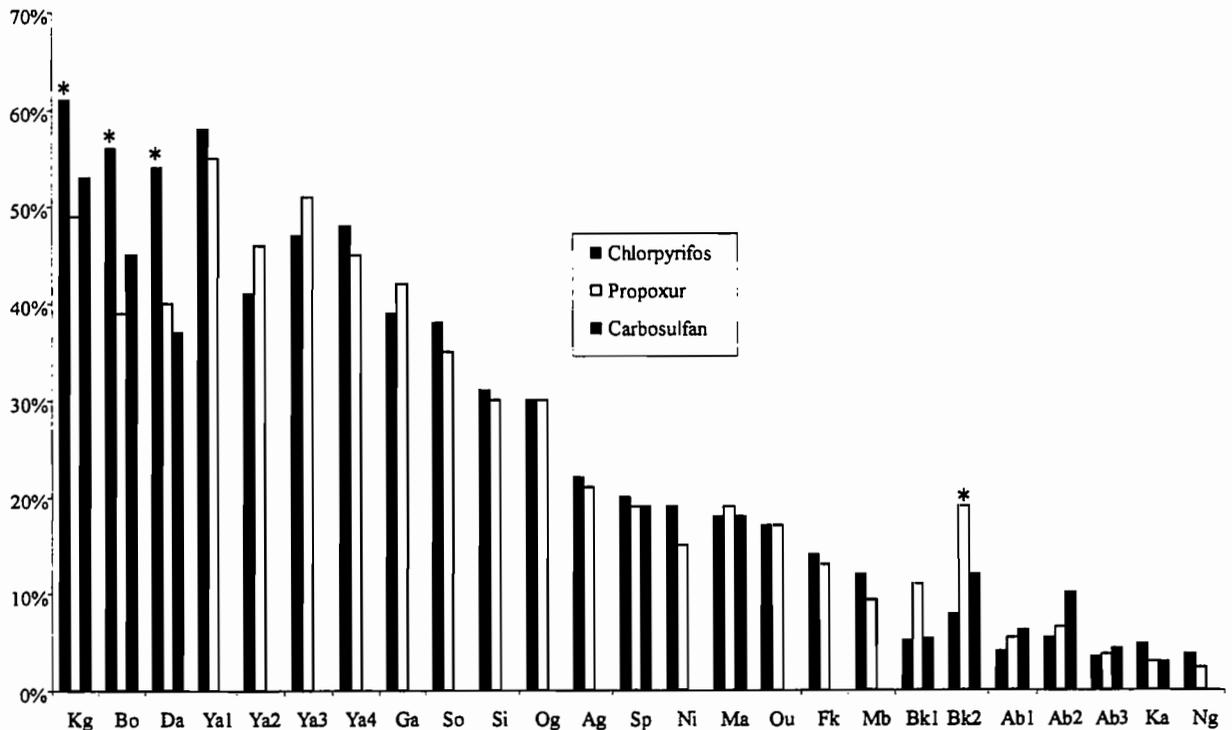


Fig. 2. Percentages of resistant phenotypes estimated from plateau mortality, on probit mortality-log dose graphs for chlorpyrifos, propoxur, and carbosulfan: evidence for a cross-resistance mechanism to organophosphates and carbamates. *, samples with significant differences observed among insecticides.

Table 3. Prevalence of organophosphate and carbamate resistance mechanisms in *Cx. p. quinquefasciatus* from Côte d'Ivoire and Burkina Faso

Towns ^a	Overproduced Esterases				Insensitive AChE			
	A2-B2	B1	C2	n	Ace ^{SS}	Ace ^{RS}	Ace ^{RR}	n
Côte d'Ivoire								
Kg	81.3	—	54.2	48	42.1	49.1	8.8	57
Bo	74.5	—	8.5	47	50.0	41.4	8.6	58
Da	83.0	—	46.8	47	60.7	33.9	5.4	56
Og	95.8	10.4	37.5	48	56.3	35.4	8.3	48
Sp	73.3	—	55.6	45	82.2	17.8	—	45
Ma	95.8	6.3	41.7	48	78.7	19.1	2.1	47
Bk	100	—	41.7	48	87.5	12.5	—	48
Ab	93.7	10.6	37.7	159	93.1	3.4	3.4	58
Ka	83.9	—	11.8	93	96.6	3.4	—	58
Burkina Faso								
Oa	39.6	—	12.5	48	100	—	—	58
Bd	55.3	—	25.5	47	100	—	—	48

Frequencies of insects with a particular esterase and frequencies of AChE genotypes are given as percentages. n, Number of mosquitoes assayed.

^a See Fig. 1 for explanation of these symbols.

Ya) and 2 towns in Burkina Faso (Bd, Oa) to compare resistance levels of *Cx. p. quinquefasciatus* among districts. Because dose-mortality relationships with chlorpyrifos and carbamates displayed a plateau in the 3 towns in Côte d'Ivoire, we tested the difference between frequencies of the resistant phenotype larvae among districts. These frequencies were not significantly different, except in 2 cases (Fig. 2)— for propoxur, the frequency of the resistant phenotype was higher in Bk2 than in Bk1, and for chlorpyrifos and propoxur it was higher in Ya1 than in Ya2, Ya3, and Ya4. These differences may be related to small temporal variations because in these 2 cases, breeding sites were sampled at intervals of 1 mo. Parallelism of probit lines from samples from different districts was not rejected with temephos at the 5% level. RR at LC₅₀ did not vary significantly among districts except in Ab, but the difference did not exceed 1.8 times.

In Burkina Faso, 2 districts were tested in Bd and Oa, and a significant difference was observed only for chlorpyrifos in Oa. This difference was low and did not exceed 1.8 times.

Identification of Resistance Mechanisms to Organophosphates and Carbamates. Overproduced Esterases. Single individuals displayed several esterases of high activity (Table 3). Two esterases, always associated and identified as A2-B2, were found in all samples tested. In Côte d'Ivoire, A2-B2 were at higher frequencies (73–100%) than in Burkina Faso (40–50%). Two other esterases of high activity, also present in these populations, were found for the first time in West Africa. The 1st one, which preferentially hydrolyzed α -naphthyl acetate and has the same electrophoretic mobility as C2 from Puerto Rico, was found at varying frequencies in all samples. The 2nd one, which preferentially hydrolysed β -naphthyl acetate and has the same electrophoretic mobility as B1 from California but with a much lower activity, was present at low frequency (10%) in 3 populations in Côte d'Ivoire (Ab, Og,

Ma). The role of these 2 esterases in organophosphate resistance is unknown at present.

Insensitive Acetylcholinesterase. Mosquitoes with an insensitive AChE were identified in all populations displaying a mortality plateau for chlorpyrifos, propoxur, and carbosulfan (Table 3). In each sample, the frequency of mosquitoes with Ace^{SS} genotype was not significantly different from the mortality observed at the plateau in bioassays with chlorpyrifos, propoxur, or carbosulfan. This result indicated clearly that insensitive AChE was the main mechanism of cross-resistance to the 3 insecticides. It also showed effective dominance of the Ace^R allele.

Discussion

In West Africa, *Cx. p. quinquefasciatus* displayed large variation in resistance to organophosphates and carbamates. Clear differences were observed among populations within and between the 2 countries investigated that will effect control strategies.

Populations were slightly resistant to organophosphates, and at least 2 known mechanisms were involved: overproduced esterases and insensitive AChE. A2-B2 esterases were found in all samples. These 2 esterases, first observed in West Africa by Villani et al. (1983), previously were shown to confer a low resistance level to organophosphates in Ouagadougou (Burkina Faso) and Bouaké (Côte d'Ivoire) (Majori et al. 1986, Magnin et al. 1988). The frequencies of A2-B2 was higher in Côte d'Ivoire than in Burkina Faso, indicating that the former populations were submitted to a stronger selection pressure by organophosphates. This conclusion was supported by the greater increase in A2-B2 frequency in Bouaké (Bk) (from 60 to 98%) than in Ouagadougou (Oa) (from 30 to 40%) since 1986.

Two A and B type esterases (i.e., "C2" and "B1") also were identified for the first time in West Africa.

However, further studies are needed to assess their role in organophosphate resistance and to determine whether they are identical to C2 from Puerto Rico and B1 from California.

Biochemical assays and bioassays revealed that an insensitive AChE was present in 24 of the 26 samples collected in Côte d'Ivoire. The agreement between the proportion of *Ace^R* carriers and the mortality plateau observed in bioassays with chlorpyrifos confirmed that this insensitive target conferred a significantly higher level of resistance to chlorpyrifos than did esterases. In contrast, *Ace^R* conferred only low resistance to temephos, because the dose-mortality curves were always linear. A similar observation was made with *Cx. p. pipiens* (L.) from France, where an insensitive *Ace^R* allele produced a 12 times lower resistance to temephos than to chlorpyrifos (Raymond et al. 1986).

The wide distribution of *Ace^R* in Côte d'Ivoire theoretically could result either from the spread of a single mutation or from the independent occurrence of the same or different mutations in many localities. However, in other countries the unique origin and subsequent worldwide spread of A2-B2 resistance genes has been well documented (Raymond et al. 1991, Guillemaud et al. 1996). The presence of A2-B2 esterases in all our samples from Côte d'Ivoire and Burkina Faso indicated that a certain amount of gene flow is occurring or has occurred recently among populations. The variability in *Ace^R* frequencies among Côte d'Ivoire towns could be attributed to differences in insecticide selection pressure or to differences in time since *Ace^R* was introduced. Fitness cost associated with an insensitive AChE gene has been demonstrated for *Cx. p. pipiens* under laboratory conditions as well as in natural environments (Raymond et al. 1985, Chevillon et al. 1995). The absence (or very low frequency) of *Ace^R* in the main towns of Burkina Faso probably was caused by a lower insecticide selection pressure in this country than in Côte d'Ivoire, as was indicated by lower A2-B2 frequencies. Alternatively, *Ace^R* may have appeared initially in Côte d'Ivoire and has not had time to spread to Burkina Faso. At present, the border between the 2 countries seems to serve as a barrier for the spread of *Ace^R*. This allele was present at the border town Niangoloko (Ng), but was absent at Banfora (Ba) only 40 km farther north. In West Africa, roads are the main means of transportation for people and goods. Niangoloko is crossed by the only road connecting the 2 countries, and a customs post is located a few hundred meters south of the town. Most vehicles coming from Côte d'Ivoire are stopped there for several hours (sometimes several days) for customs formalities before being allowed to proceed. Most adult mosquitoes, passively transported in vehicles coming from Côte d'Ivoire, probably either seek resting sites in Niangoloko or die in vehicles after several hours of exposure to the sun. Therefore, most vehicles from Côte d'Ivoire are probably free of mosquitoes when leaving Niangoloko for

Burkina Faso, which may delay the spread of *Ace^R* into *Cx. p. quinquefasciatus* populations in this country. Further genetic studies will be performed on mosquito samples to investigate gene flow between Côte d'Ivoire, Niangoloko, and other towns in Burkina Faso.

In populations of the *Cx. pipiens* complex, insensitive acetylcholinesterase alleles usually appear several years after intensive selection pressure with organophosphates and when overproduced esterases already are distributed widely. Then, *Ace^R* spreads among populations depending on the intensity of selection pressure, as was observed in France (Raymond et al. 1985, Chevillon et al. 1995), Italy (Villani and Hemingway 1987, Severini et al. 1993), and Cuba (Bisset et al. 1990). However, in Spain, *Ace^R* frequencies in *Cx. p. pipiens* were not correlated with organophosphate treatments (Chevillon et al. 1995), and in Tanzania the *Ace^R* allele was reported from areas where there is no organized mosquito control (Khayrandish and Wood 1993). In Côte d'Ivoire, only sporadic mosquito control campaigns have been carried out during the last 20 yr and attempts to relate resistance levels to the agricultural use of insecticides were not conclusive. In Africa, *Cx. p. quinquefasciatus* is associated closely with urban environments and it is likely that the main selection pressure exerted is by the domestic use of insecticides. This conclusion seems in agreement with the absence of, or small variations in, insecticide resistance within towns in Côte d'Ivoire and Burkina Faso, where the overall insecticide pressure may be more or less similar among districts. Alternatively, gene flow between districts may be high as indicated by preliminary investigations on the genetic structure of *Cx. p. quinquefasciatus* in some Côte d'Ivoire towns (unpublished data).

In conclusion, despite the coexistence of several resistance genes in West Africa, the level of organophosphate resistance has remained relatively low, possibly because selection pressure from domestic use of insecticides is low compared with that resulting from systematic and organized mosquito control programs. However, resistance genes able to confer high resistance levels to certain insecticides are present and must be taken into account when planning organized mosquito control. The different resistance patterns observed in Côte d'Ivoire and Burkina Faso also should be considered. In Côte d'Ivoire, organophosphates still may be efficient for *Culex* control because resistance levels are low. However, increased use rapidly will select an increase in resistance because A2-B2 and *Ace^R* are present in all cities. *Ace^R* confers lower resistance to temephos than to chlorpyrifos, indicating that some organophosphate compounds may remain active in spite of its presence, as was observed for pirimiphosmethyl in Cuba (Bisset et al. 1991). In addition, a rotational scheme with organophosphates and other insecticides such as *Bacillus sphaericus* may decrease the intensity of selection for organophos-

phate resistance genes. In Burkina Faso, both organophosphates and carbamates still are effective for mosquito control. An increase of insecticide selection pressure will increase the frequency of A2-B2 esterases, and the risk exists that *Ace^R* will spread from Côte d'Ivoire. At an operational level, it is important that susceptibility level and evolution of resistance genes in target populations are monitored routinely.

Acknowledgments

We thank Agrevo, Bayer, and FMC for providing technical insecticides. We are grateful to F. Fumoux (Director of Centre Muraz, Bobo-Dioulasso) for his helpful support in Burkina Faso; R. N'guessan and B. Salou for mosquito rearing and technical assistance; S. Ouedraogo, A. Cisse, B. Koffi, A. Konate, and N. Barberi for technical assistance; D. Bourguet for his help with the AChE test; S. Manguin for critical reading of this paper; and all staff members from IPR and ORSTOM in Bouaké. This study was supported, in part, by OCCGE, ORSTOM, and MESR (Grant No. 92-058; ACC-SV3 No. 95.03.037).

References Cited

- Abderrazak, S. B., F. Guerrini, F. Mathieu-Daudé, P. Truc, K. Neubauer, K. Lewicka, C. Barnabé, and M. Tibayrenc. 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization, pp. 361-382. In J. E. Hyde [ed.], *Methods in molecular biology*, vol. 21: Protocols in molecular parasitology. Humana, Totowa, NJ.
- Adam, J. P., J. Hamon, and J. Chevalier. 1958. Observations complémentaires sur la résistance aux insecticides chez les moustiques de la région d'Abidjan (Basse Côte-d'Ivoire). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 51: 662-666.
- Bisset, J. A., M. M. Rodriguez, C. Diaz, E. Ortiz, M. C. Marquetti, and J. Hemingway. 1990. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Bull. Entomol. Res.* 80: 245-250.
- Bisset, J. A., M. M. Rodriguez, J. Hemingway, C. Diaz, G. J. Small, and E. Ortiz. 1991. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. *Med. Vet. Entomol.* 5: 223-228.
- Brown, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 123-140.
- Chevillon, C., N. Pasteur, M. Marquine, D. Heyse, and M. Raymond. 1995. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 49: 997-1007.
- Curtis, C. F., and N. Pasteur. 1981. Organophosphate resistance in vector populations of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 71: 153-161.
- Finney, D. J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Georghiou, G. P., R. L. Metcalf, and F. E. Gidden. 1966. Carbamate resistance in mosquitoes: selection of *Culex pipiens fatigans* Wied. (= *Culex quinquefasciatus*) for resistance to Baygon. *Bull. W.H.O.* 35: 691-708.
- Georghiou, G. P., N. Pasteur, and M. K. Hawley. 1980. Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. *J. Econ. Entomol.* 73: 301-305.
- Guillemaud T., S. Rooker, N. Pasteur, and M. Raymond. 1996. Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Heredity* 77: 535-543.
- Hamon, J., and J. Mouchet. 1967. La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. *Bull. W.H.O.* 37: 277-286.
- Hamon, J., M. Eyraud, S. Sales, and J. P. Adam. 1958. Observations sur le niveau de sensibilité au DDT, au dieldrin et au HCH de *Culex pipiens ssp. fatigans* dans la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta, Afrique Occidentale Française. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 51: 393-404.
- Hamon, J., M. Eyraud, B. Diallo, A. Dyemkouma, H. Bailly-Choumara, and S. Ouanou. 1961. Les moustiques de la République du Mali (Dipt. Culicidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 130: 95-129.
- Khayrandish, A., and R. J. Wood. 1993. A multiple basis for insecticide resistance in a strain of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Muheza, Tanzania, studied as resistance declined. *Bull. Entomol. Res.* 83: 75-86.
- Magnin, M., E. Marboutin, and N. Pasteur. 1988. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J. Med. Entomol.* 25: 99-104.
- Majori, G., G. Sabatinelli, F. Villani, and V. Petrarca. 1986. Studies on insecticide resistance of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in the area of Ouagadougou, Burkina Faso (West Africa). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 305-309.
- Mouchet, J., J. Dejardin, and R. Subra. 1968. Sensibilité aux insecticides de *Culex pipiens fatigans* en Afrique de l'Ouest. *Méd. Trop.* 28: 374-394.
- Pasteur, N., G. Pasteur, J. Catalan, F. Bonhomme, and J. Britton-Davidian. 1988. *Practical isozyme genetics*. Ellis Horwood, Chichester, England.
- Poirié, M., M. Raymond, and N. Pasteur. 1992. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochem. Genet.* 30: 13-26.
- Raymond, M., and M. Marquine. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: The Corsican paradox. *J. Evol. Biol.* 7: 315-337.
- Raymond, M., B. Gaven, N. Pasteur, and G. Sinègre. 1985. Etude de la résistance au chlorpyrifos à partir de quelques souches du moustique *Culex pipiens* L. du sud de la France. *Genet. Sel. Evol. (Paris)* 17: 73-88.
- Raymond, M., D. Fournier, J. M. Bride, A. Cuany, J. Bergé, M. Magnin, and N. Pasteur. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *J. Econ. Entomol.* 79: 1452-1458.
- Raymond, M., N. Pasteur, G. P. Georghiou, R. B. Mellon, M. C. Wirth, and M. K. Hawley. 1987. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 24: 24-27.
- Raymond, M., A. Callaghan, P. Fort, and N. Pasteur. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature (Lond.)* 350: 151-153.
- Raymond, M., G. Prato, and D. Ratsira. 1993. PROBIT analysis of mortality assays displaying quantal response, version 3.3. Licence L93019. Praxème, 34680 St. Georges d'Orques, France.

- Rice, W. R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Severini, C., R. Romi, M. Marinucci, and M. Raymond. 1993. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 164-168.
- Subra, R., S. Sales, and B. Bouchite. 1968. Spectres de sensibilité aux insecticides des populations de *C. p. fatigans* en Afrique occidentale et évaluation de larvicides sur le terrain. 8ème conf. techn. de l'Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies, Bamako.
- Villani, F., and J. Hemingway. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27: 218-228.
- Villani, F., G. B. White, C. F. Curtis, and S. J. Miles. 1983. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 73: 153-170.
- Wirth, M. C., M. Marquine, G. P. Georghiou, and N. Pasteur. 1990. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in organophosphate resistance and linkage. *J. Med. Entomol.* 27: 202-206.
- Yébakima, A., M. Raymond, M. Marquine, and N. Pasteur. 1995. Resistance to organophosphorous insecticides in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Martinique. *J. Med. Entomol.* 32: 77-82.

Received for publication 10 December 1996; accepted 3 June 1997.

Article 2

Chandre F., Darriet F., Doannio J.M.C, Rivière F., Pasteur N., Guillet P.
1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *Journal of Medical Entomology*. 34: 664-671.

**INTERACTION OF MULTIPLE ORGANOPHOSPHATE AND CARBAMATE
RESISTANCE GENES IN *CULEX PIPIENS QUINQUEFASCIATUS* FROM WEST AFRICA**

Fabrice Chandre¹, Denis Bourguet², Nicole Pasteur³, Pierre Guillet¹

ORSTOM, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, BP 5045, 34032 Montpellier
cedex 1, France

INRA, Station de Recherches de Lutte Biologique. La Minière, 78285 Guyancourt Cedex,
France

CNRS UMR 5554, Laboratoire de Génétique et Environnement, Institut des Sciences de
L'Evolution, Université de Montpellier II (CC 065), 34095 Montpellier, France

INTRODUCTION

Culex pipiens quinquefasciatus Say is a pantropical pest and vector of urban Bancroftian filariasis in Southeast Asia and East Africa. As a consequence this species was submitted to strong selection pressure through insecticide treatment for many years. In West Africa, first cases of organophosphate resistance were observed since the beginning of the 1960s, only few years after these insecticides had replaced DDT and dieldrin for urban pest control. Chlorpyrifos resistance was found associated with two esterases of high activity in populations of West Africa (Liberia) and East Africa (Curtis & Pasteur, 1981; Villani *et al.*, 1983). These esterases further designated as A2-B2 were responsible for low levels of organophosphate resistance in Ouagadougou (Burkina Faso) (Majori *et al.*, 1986) and Bouaké (Côte d'Ivoire) (Magnin *et al.*, 1988).

More recently, a survey of *Cx. quinquefasciatus* in Côte d'Ivoire and Burkina Faso have shown that organophosphate and carbamate resistance was widespread among populations of this mosquito (Chandre *et al.*, 1997). In Côte d'Ivoire, resistance was associated with insensitive acetylcholinesterase and esterases A2-B2. Two other overproduced esterase alleles named C2 and B1, because of their identical electrophoretic mobility than C2 from Puerto Rico and B1 from California, were also observed in *Cx. quinquefasciatus* populations from Côte d'Ivoire. However, their role in organophosphate resistance was not investigated. Here we report the study of two field resistant strains from Côte d'Ivoire which laboratory selected for organophosphate and carbamate resistance to determine the contribution of each mechanism to resistance as well as their possible interactions.

MATERIALS AND METHODS

Mosquitoes

Two strains of *Cx. p. quinquefasciatus* coming from field resistant populations were selected for 21 generations either with an organophosphate or a carbamate:

- Kop isolated from Abidjan, the capitale of Côte d'Ivoire, and selected as fourth instar larvae at 70-90 % mortality level with chlorpyrifos ethyl. Selection concentration was initially 0.007 mg/l and was gradually increased to 0.5 mg/l for 21st generation (F21).
- Super-Car was obtained from Bouaké, 350 km at north of Abidjan, and selected as fourth instar larvae with propoxur. Initial and final concentration were respectively 0.8 mg/l (F0) and 500 mg/l (F21).

For each strain at F0, F3, F6, F9, F13, and F20 generation a sample of unselected larvae was breed until adult stage and frozen (-80°C) for biochemical assays and electrophoresis.

Resistance level of laboratory strains were compared to S-Lab, a susceptible reference strain (Georghiou *et al.*, 1966) reared and tested under the same conditions.

Larval Bioassays

Six organophosphates an one carbamate of technical grade quality were used: chlorpyrifos-ethyl (99.8%) [Agrevo, Berkhamsted, UK], temephos (96.5%) [Agrevo], fenitrothion (94.3%) [Agrevo], pyraclofos (95.1%) [Takeda Chemical, Japan], chlorphoxim (83.7%) [Bayer, Leverkusen, Germany], pirimiphos methyl (96.7%) [Zeneca, Bracknell, UK] and propoxur (99.4%) [Bayer]. Insecticide solutions were made in 95% ethanol and stored at 4°C for less than 2 mo.

Resistance level to chlorpyrifos and propoxur were regularly checked during selection process. Bioassays were performed on late 3rd and early 4th instars. Sets of 20 larvae were assayed in 99 ml of distilled water, to which 1 ml of insecticide solution at the required concentration was added. Five replicates of 20 larvae per concentration, and 5-10 concentrations providing between 0 and 100% mortality were used for each bioassay. Mortality was recorded after a 24 hr exposure. Controls were made with 1 ml of ethanol and mortality never exceeded 4%. Temperature was maintained at 27±1°C during bioassays.

Synergist assays

The effect of two classical synergists, DEF [S,S,S tributyl phosphorotrithioate, Interchim, Asnières, France] an inhibitor of esterases and glutathione-S-transferases, and PBO [piperonyl butoxide, Fluka, St-Quentin, France] an inhibitor of oxidases was tested on both strains after 15 or 16 generations. Synergists were used at 0.008 mg/l for DEF and 1 mg/l for PBO, the maximum sublethal concentrations for S-Lab. Larvae were exposed to synergist 4 hours prior to insecticide, and maintained for 24 hours in insecticide plus synergist solution.

Evolution of resistance mechanisms during selection

Determination of acetylcholinesterase (AChE1) genotypes

AChE1 genotypes were determined on single adult using a microplate assay (Bourguet *et al.*, 1996a). 30 to 48 adult mosquitoes were individually grind in 400 µl of sodium phosphate buffer (pH 7) containing 1% Triton X-100 and then centrifuged at 10,000 rpm for 5 mn. For each mosquito 100 µl of supernatant were transferred in 3 wells of a microplate. Propoxur in ethanol was used as inhibitor of AChE1. for the 3 wells, 10 µl of ethanol alone (control), 10 µl of propoxur 1 mM and 10 µl to propoxur 100 mM were respectively added. Microplate was left 10 mn at room temperature before addition of 100 µl of sodium phosphate buffer containing 0.2 mM DTNB and 2.5 mM acetylthiocholine iodide. Microplates were read on Dynatech spectrophotometer using 420 nm wavelength filter. Genotype frequencies were identified as follow:

- a complete inhibition of AChE1 activity in well with 100 mM of propoxur indicated susceptible genotype (*Ace.1^{SS}*),
- a higher inhibition of AChE1 activity with 100 mM than 1 mM indicated heterozygous genotype (*Ace.1^{RS}*)
- identical inhibitions or no inhibition with 1 mM and 100 mM indicated homozygous resistant genotype (*Ace.1^{RR}*)

Determination of overproduced esterases phenotypes

Identification of phenotypes for esterases were investigated on single adults using electrophoresis on cellulose acetate plates (HELENA system) as described in Abderrazak *et al.* (1993). Migration was made with Tris-Maleate-EDTA buffer (pH 7.4). Gels were soaked in dilute migration buffer (1/8) and run at 200 V for 23 min. Staining procedure was adapted

from Pasteur et al. (1988) for starch gels. Gels were incubated (2 min.) with 10 mg of α - and β -naphthyl acetate in phosphate buffer (pH 6.5). Bands were stained with 10 mg of Fast Garnett GBC. 30 to 48 individuals were analysed for each strain and generation. Electrophoretic patterns of mosquitoes were compared with reference strains with known esterase alleles: Tem-R strain (Georghiou *et al.*, 1980) for B1, Puerto for C2 (Yébakima *et al.*, 1995) and SeLax for A2-B2 (Wirth *et al.*, 1990).

Determination of general esterase activity

Esterase activity was measured on microplate assays according to the methods of Ferrari and Georghiou (1990) and Guillemaud *et al.* ((1998)) with few modifications. Each adult mosquito was grind in 200 μ l of sodium phosphate buffer (PB, pH 6.5) and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 mn. Supernatant was diluted with PB so that optical density (OD) was within the linearity range of microplate reader (*i.e.* 1/4 for S-Lab, 1/4 and 1/8 for Super-Car, 1/8 and 1/16 for Kop). Microplates were filled with 90 μ l of PB containing 1% Triton X-100, to which 10 μ l of dilute supernatant were added. 100 μ l of substrate solution (0.5 ml α -naphthyl acetate 60 mM, 2.5 ml PB with 1% Triton, 7 ml of distilled water) were added to each well. Microplates were incubated for 30 min at 25°C. Esterase activities was revealed with 100 μ l of Fast Garnett GBC (0.8 mg/ml). Microplates were read on Dynatech spectrophotometer using 550 nm wavelength filter. OD values were transformed in nmol of α -naphthol produced using a standard curve of α -naphthol. Each assay was made with 30-32 mosquitoes and for each mosquito three replicates were made.

Determination of protein content in supernatant were made with a ready-to-use protein kit [Coomassie® Plus Protein Assay Reagent, PIERCE, Rockford, USA] based on method of Bradford (1976) and using a standard curve of Bovine Serum Albumin.

Comparison of AChE1 properties in susceptible and resistant strains

AChE1 purification

Kinetic properties of AChE1 of resistant strains were analyzed on individuals issued from couple in which both parents were homozygous for insensitive AChE1. AChE was purified from heads of adult mosquitoes which are almost deprived of AChE2 (Bourguet *et al.*, 1996c). For each strain, ~1,000 heads were homogenized in 20 ml extraction buffer (20 mM Tris pH 7.0, containing 0.1% Triton X-100) with a glass pestle. Homogenates were

centrifuged at 10,000g for 5 min. Supernatants were loaded on affinity chromatography columns containing procainamide, a specific ligand of the AChE active site ((Pasteur *et al.* 1996)). Columns were washed with 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.1% Triton X-100, and the bound enzyme was eluted with 50 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.4% CHAPS, 2.5 mM decamethonium. The eluted fractions were dialyzed 3 times during 2 hr against the extraction buffer resulting in a 10^6 fold dilution. The resulting purified AChE was used for kinetic analyses of AChE1.

Evaluation of catalytic parameters

AChE1 activities were determined by the photometric method of Ellman *et al.* (1961). AChE1 enzymatic activity of each strain (five replicates) was measured using acetylthiocholine (AcSCh), butyrylthiocholine (BuSCh) and propionylthiocholine (PrSCh) at a concentration of 1 mM. AChE1 substrate preferences were calculated using AcSCh as reference, *i.e.* by computing the following activity ratios (in $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$): (BuSCh/AcSCh) and (PrSCh/AcSCh). For each strain, bimolecular rate constants (k_i 's) for three carbamates (eserine, aldicarb and propoxur) and two oxon forms of organophosphates (malaoxon and paraoxon) were estimated for AChE1 following the dilution method of Aldridge (Aldridge, 1950). Briefly, purified AChE1 were incubated with the inhibitor for various times before adding 100 μl of these inhibition mixtures into 100 μl of a substrate-reagent solution (final concentration: 1.7 mM DTNB [5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid]; 2.5 mM AcSCh). The plot of the natural logarithm of residual activity (A_i/A_o) against time, for a given inhibitor concentration, is linear when only one AChE1 is present (sensitive or insensitive). The slope of the line divided by the inhibitor concentration gives the k_i .

Data analysis

Mortality data were analysed using a log-probit software (Raymond *et al.*, 1993a), based on Finney (1971). Regression lines were considered identical when hypothesis of parallelism were not rejected at 5% level and when the ratio of their lethal concentrations was not significantly different from the value 1. When mortality data were not linear, values for lethal concentrations were estimated graphically after plotting on log-probit paper. Variance analysis was used to compare esterase activity levels.

RESULTS

Evolution of resistance in both strains

Evolution of chlorpyrifos resistance

Resistance ratios at LC_{50} (RR_{50}) of the two natural populations were initially identical respectively 5.0 for Kop F0 and 4.8 for Super-Car F0 (Fig. 1). RR_{50} of Kop rose to 14 after 3 generations of chlorpyrifos selection and further gradually increased until 319 after 21 generations. On the contrary, the resistance level which was reached by Super-Car after only 6 generations ($RR_{50}=23$) remained unchanged until F21 selection ($RR_{50}=26$). For Kop F21 and Super-Car F21 mortality data were well fitted by a straight line ($P > 0.05$) indicating that strains were homogeneous for chlorpyrifos resistance.

Evolution of propoxur resistance

Initial RR_{50} of the two natural populations were low and similar respectively 2.1 for Kop F0 and 2.7 for Super-Car F0 (Fig. 2). A plateau around 50% mortality was observed for Kop F3, indicating that a major resistance mechanism was segregating for propoxur resistance. A high resistance level was reached for Kop F16 ($RR_{50}=2310$) and the absence of plateau suggested homogeneity for propoxur resistance. A slight but significant increase of resistance was observed for Kop F21 ($RR_{50}=4240$). A plateau was also observed in successive generations of Super-Car until F21 where it disappeared ($RR_{50}=4440$). Probit mortality lines of Kop F21 and Super-Car F21 were parallel ($P > 0.9$) and their RR were not significantly different indicating that their propoxur resistance levels were identical.

Comparison of resistance level to various organophosphates

Bioassays were made to test if high differences of chlorpyrifos resistance levels between two strains extended to other organophosphates (Table 1). Both strains displayed a broad resistance spectrum to all organophosphates tested. Kop was significantly more resistant than Super-Car with temephos, fenitrothion, and chlorphoxim. However differences between resistance levels among resistant strains was lower with these three insecticides (2.5 to 3.5 fold between RR_{50}) than with chlorpyrifos (12 fold for RR_{50}). For pirimiphos methyl, lines were not parallel but their RR_{95} were not significantly different. Resistance level to pyraclofos were identical for both strains (slopes and RR s not significantly different).

Effect of synergists

Synergism studies were made with the 16th generation of Kop and the 15th generation of Super-Car (Fig. 3). DEF significantly increased the toxicity of chlorpyrifos for S-Lab whereas PBO significantly decreased it (Fig. 3A). This is usually observed as even in susceptible insects natural esterases play a role in organophosphate detoxification whereas oxidases convert organophosphate in oxon metabolites which are the active forms inhibiting AChE. However these two synergists, DEF and PBO, did not modified significantly the chlorpyrifos resistance level of Kop. This was unexpected for DEF, as it was strongly suspected that esterases of high activity would be selected by chlorpyrifos.

DEF did not affect propoxur toxicity for S-Lab whereas PBO significantly increased it (Fig. 3B). These two synergists had no impact on propoxur resistance level of Super-Car.

Evolution of resistance mechanisms

Insensitive AchE1

Because inheritance of insensitive AChE1 in Côte d'Ivoire was dominant (Bourguet *et al.*, 1997; Chandre *et al.*, 1997) Fig. 4 and 5 indicate frequency of resistant phenotypes for AChE1 (*i.e.* *Ace.1^{RR}* plus *Ace.1^{RS}*). The initial frequency of resistant phenotypes were not significantly different in the two initial populations Kop F0 (10.3%) and Super-Car F0 (12.5%). Propoxur selection increased more rapidly *Ace.1^R* frequency than did chlorpyrifos, as frequency of resistant individuals was 83.9% for Super-Car F3 vs 52.1% for Kop F3. However with chlorpyrifos, since F9 almost all individuals displayed resistant phenotypes for *Ace.1^R* and homozygosity was reached at 13th generation. On the contrary, although propoxur selection induced a high frequency of resistant individuals for F9, heterozygous were still present at 20th generation.

Overproduced esterase

Overproduced esterases being a dominant marker using electrophoresis technique, data on Fig 4 and Fig. 5 indicated also phenotype frequencies for different alleles. Three resistant alleles were present in original populations of Kop strain: 96% of mosquitoes possessed A2-B2, 55% C2 and 12% B1. A2-B2 frequency did not change significantly and remained almost constant from F0 to F20 ranging from 92% to 98%. There was also no significant differences

between C2 frequencies at F0 (55.2%) and F20 (54.2%). However C2 frequency jumped to 83.3% for F3 but decreased rapidly on following generations. During 6 generations B1 frequency was low and stable around 10%. A strong increase of B1 frequency occurred from F9 (41.7%) to F20 reaching 79.2%.

Only A2-B2 and C1 were present in initial populations of Super-Car. A2-B2 frequency was high and stable until F6 (94-100%) but a significant decrease was observed for F9 (72.9%) and F20 (45.8%). Similar frequencies of C2 was observed at F0 (41.7%) and F20 (39.6%), and only small variations were observed from generation to generation.

Evaluation of esterases activities

The initial level of esterase activity was high in both resistant strains corresponding to 10.8 fold that of susceptible S-Lab strain (details not shown). This esterase activity level was identical for Kop F0 and Super-Car, respectively 1304 and 1303 nmol of α -naphthol produced per mn and mg of mosquito protein. Esterase activity increased significantly ($P < 0.001$) between F0 and F3 but returned to initial level since F9. Unexpectedly, although Kop was selected with chlorpyrifos, esterase activity level F20 was not significantly different from that of initial population F0 ($P > 0.05$). The esterase activity of Super-Car did not change significantly from F0 to F9 ($P > 0.5$), but decreased significantly at F13 and F20 indicating that overproduced esterases were selected against by propoxur.

Comparison of AChE1 properties in susceptible and resistant strains

AChE1s of S-Lab, Kop and Super-Car strains were purified and their catalytic properties analyzed. For each strain and insecticide (propoxur, eserine, malaoxon, paraoxon and aldicarb), the plot of the natural logarithm of residual AChE1 activity against time was linear (details not shown). This indicates that all individuals were homozygous at the *Ace.1* locus. For all insecticides, the inhibition constant, k_i , of AChE1 purified from resistant strains was lower ($P < 0.0001$) than that from the susceptible strain S (Table 2). This confirms that both resistant strains carried a modified AChE1 with less efficient binding to insecticides. Abilities to degrade the substrate were also significantly ($P < 0.0001$) affected as their modified AChE1s degrade propionylthiocholine and butyrylthiocholine less efficiently than the sensitive AChE1 of the susceptible strain S-Lab (Table 3).

AChE1s purified from Kop and Super-Car displayed identical catalytic properties: their inhibition constants (Table 2) for the five inhibitors were not different ($P > 0.9$) as well as their substrate preferences (Table 3) ($P > 0.9$).

DISCUSSION

Two field resistant populations of *Cx. quinquefasciatus* from two cities of Côte d'Ivoire were collected and laboratory selected either with chlorpyrifos (Kop) or propoxur (Super-Car). Both strains segregated for a major resistance mechanism to propoxur as indicated by the plateau of mortality observed in bioassays and confirmed by detection of insensitive AChE1. AChE1 being also the target site of organophosphate, a shorter mortality plateau with chlorpyrifos at the same level than propoxur was also detected in early stage of selection of Super-Car (F0, F6) and Kop (F0, F3). Chlorpyrifos selection of Kop strain resulted in 7-12 times higher resistance level to this insecticide than Super-Car. Kop and Super-Car were cross resistant to five other organophosphates but strain differences between their resistance levels were lower than with chlorpyrifos. When tested with propoxur final resistance levels of both strains were rigorously identical.

Inheritance of *Ace.1^R* allele in Super-Car being completely dominant for propoxur resistance (Bourguet *et al.*, 1997), propoxur selection did not discriminate between homozygous (*Ace.1^{RR}*) and heterozygous (*Ace.1^{RS}*). This explained why after selection for 20 generations heterozygous frequency (18%) were still high in Super-Car. Assuming Hardy-Weinberg ratios for Super-Car F20, genotypes frequency could be estimated to about 81% *Ace.1^{RR}*, 18% *Ace.1^{RS}* and 1% *Ace.1^{SS}*. This low frequency of susceptible genotypes explained the homogeneity observed for propoxur and organophosphate resistance when Super-Car F21 was tested.

Synergists and biochemical assays revealed that neither oxidases nor esterases were involved in propoxur resistance of Super-Car. Level of esterase activity was significantly lower for F20 as compared to initial field population and was associated with a decrease of A2-B2 frequency. Fitness cost associated with A2-B2 was shown under natural conditions after interruption of insecticide treatments (Severini *et al.*, 1993) as well as under laboratory conditions (Raymond *et al.*, 1993b). Negative selection of A2-B2 occurred between F6 and F9

when almost all individuals presented a resistant phenotype for propoxur resistance. The fitness cost associated with A2-B2 and *Ace.1^R* together being higher than *Ace.1^R* alone, mosquito with both A2-B2 and *Ace.1^R* alleles were progressively selected against because A2-B2 did not provide any advantage for propoxur resistance. In contrast, C2 had probably no or lower fitness cost, as its frequency remained unchanged through propoxur selection.

The evolution of resistance mechanisms through selection of Kop strain was more complicated. Dominance of insensitive AChE1 were likely not complete for chlorpyrifos resistance. This insecticide preferentially selected individuals with *Ace.1^{RR}* genotype as homozygosity for *Ace.1^R* alleles was obtained after 13 generation. Three overproduced esterase alleles were also present in initial population of Kop. A2-B2 is worldwide distributed (Raymond *et al.*, 1991) and responsible of organophosphate resistance (Wirth *et al.*, 1990), and two other alleles with the same electrophoretic mobility than C2 from Puerto Rico and B1 from California. In a previous study (Chandre *et al.*, 1997) C2 was found widespread among *Cx. quinquefasciatus* populations of Côte d'Ivoire, and B1 was detected in some of them but their role in organophosphate resistance were unknown. Although A2-B2 provides organophosphate resistance and were present in 95% of mosquitoes of first Kop generation, its frequency remained unchanged even after 20 generations of chlorpyrifos selection. This was also the case for C2, although a transient increase of C2 frequency was observed at F3. B1 frequency was stable at low level until F6 and then increased on following generations until 79% for F20 indicating that this esterase conferred selective advantage under chlorpyrifos selection pressure. It is noteworthy that increase of B1 coincided with high frequency reached by mosquitoes with resistant phenotype for *Ace.1^R* allele. This result suggested that B1 did not contribute significantly to resistance as compared to *Ace.1^R* and consequently was not selected at early stage of selection. However, when almost all individuals were *Ace.1^{RR}* then the small additional advantage conferred by B1 allows its selection. This could explain why there was apparently no detectable synergist effect between DEF and chlorpyrifos resistance of Kop F16 although esterases was strongly suspected to confer at least a part of chlorpyrifos resistance. When detoxification mechanism such as esterases and target site insensitivity such as *Ace.1^R* are present together the resulting resistance is an additive combination of both mechanisms (Raymond *et al.*, 1989). In such situation if resistance level conferred by detoxification is much lower than that conferred by insensitivity of target, as it seemed the case of our present study, the use of synergist will not

decrease significantly resistance because of the low contribution of detoxification to overall resistance. This was confirmed through several studies with *Cx. pipiens* from France (Wood *et al.*, 1984), Italy (Bonning & Hemingway, 1991a) and *Cx. quinquefasciatus* from Tanzania (Khayrandish & Wood, 1993). The low contribution of esterases to resistance was also confirmed in our study by absence of increase in esterase activity level between F0 and F20. The high increase of B1 frequency whereas those of A2-B2 and C2 did not vary from F0 to F20, would have had to be associated with an increase of overall esterase activity level. To explain this contradictory results we can guess that either B1 did not contribute significantly to overall esterase activity level or that contribution of A2-B2 and C2 were simultaneously diminished although their frequencies remained unchanged *e.g.* through selection against individuals with the highest levels of esterase amplification. Selection against high esterase activity levels was previously described with malathion in a strain (MAL) possessing also insensitive AChE1 and overproduced esterases (Bonning & Hemingway, 1991b). Esterase activity level of MAL strain declined as long as insensitive AChE1 frequency was increasing. A few generations after homozygosity of insensitive AChE1 was reached, then esterase activity rose up. Selection of Kop Strain was may be not maintained enough generations, to show a significant contribution of esterases in resistance.

Nevertheless, the low contribution of esterases in chlorpyrifos resistance did not explain the high differences of resistance levels observed between our two strains. DEF being also an inhibitor of glutathion-S-transferases, it is unlikely that they were involved in organophosphate resistance. Investigations were made to assess if these differences could be attributed to different *Ace.1^R* alleles in both strains.

Catalytic properties of insensitive AChE1s were identical in Kop and Super-Car indicating that they probably possessed the same resistant allele *Ace.1^R*. This is because, as shown in *D. melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994), each substitution of amino acids or combination of substitutions involved in insecticide resistance results in distinct catalytic properties. Only five mutations responsible for insecticide resistance have been identified in *D. melanogaster* (Fournier *et al.*, 1992; Morton & Singh, 1982; Mutero *et al.*, 1994) and some of them have also been found in a resistant *Musca domestica* strain (Williamson and Devonshire, personal communication). Other changes would also generate insecticide resistance (Mutero *et al.*, 1992) but they affect essential amino acids belonging to the active-site and result in drastic alterations in the catalytic properties of the enzyme (Gibney *et al.*,

1990; Krejci *et al.*, 1991). Thus, like in *D. melanogaster* and *M. domestica*, only a few possible changes of amino acids render the AChE1 of *Culex pipiens* less sensitive to insecticides while retaining enough enzyme activity for an efficient neurotransmitter metabolization.

Based on catalytic properties, the allele found in Ivory Coast was also probably present in Martinique and Cuba (Bourguet *et al.*, 1996b), in Southern France, Tunisia and Italy (Bourguet *et al.*, 1997) and in Portugal (unpublished data). Thus, although another *Ace.1^R* alleles have been found in Cyprus (Bourguet *et al.*, 1996a; Wirth & Georghiou, 1996) and in Burma (Tang *et al.*, 1990), the same present allele has a wide distribution.

Based on all this results neither detoxification nor differences between *Ace.1^R* alleles accounted for higher organophosphate resistance level in Kop strain as compared to Super-Car. Whatever was this unidentified mechanism, it is noteworthy that it conferred highest resistance to the compound used for its selection and no or only low differences with other organophosphates tested. All other known mechanisms being excluded, it is possible that chlorpyrifos selected reduced insecticide penetration. This mechanism was involved in temephos and chlorpyrifos resistance of laboratory strains of *Cx. quinquefasciatus* (Raymond *et al.*, 1989) and was suspected in a chlorpyrifos resistant strain from Tanzania (Khayrandish & Wood, 1993). Reduced penetration was suspected to confer only low level of resistance but it combined multiplicatively with other resistance mechanisms such as detoxification or target site modification leading to significantly increase resistance level (Raymond *et al.*, 1989).

References

- Abderrazak, S.B., Guerrini, F., Mathieu-Daudé, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabé, C. & Tibayrenc, M. 1993. Isoenzyme Electrophoresis for Parasite Characterization, *In Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology*, pp. 361-382., Hyde, J.E. (ed), Vol. 21: . Humana Press Inc., Totowa NJ.
- Aldridge, W.N. (1950) Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochemical Journal*, **46**, 451-460.
- Bonning, B.C. & Hemingway, J. (1991a) The efficacy of acetylcholinesterase in organophosphorus and carbamate resistance in *Culex pipiens* L. from Italy. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **40**, 143-148.
- Bonning, B.C. & Hemingway, J. (1991b) Identification of reduced fitness associated with an insecticide resistance gene in *Culex pipiens* by microtitre plate tests. *Medical and Veterinary Entomology*, **5**, 377-379.
- Bourguet, D., Pasteur, N., Bisset, J. & Raymond, M. (1996a) Determination of Ace.1 Genotypes in Single Mosquitoes: Toward an Ecumenical Biochemical Test. *Pestic Biochem Physiol*, **55**, 122-8.
- Bourguet, D., Raymond, M., Bisset, J., Pasteur, N. & Arpagaus, M. (1996b) Duplication of the Ace.1 locus in *Culex pipiens* mosquitoes from the Caribbean. *Biochem Genet*, **34**, 351-62.
- Bourguet, D., Raymond, M., Fournier, D., Malcolm, C.A., Toutant, J.P. & Arpagaus, M. (1996c) Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Neurochemistry*, **67**, 2115-2123.
- Bourguet, D., Lenormand, T., Guillemaud, T., Marcel, V., Fournier, D. & Raymond, M. (1997) Variation of dominance of newly arisen adaptive genes. *Genetics*, **147**, 1225-34.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

- Chandre, F., Darriet, F., Doannio, J.M.C., Rivière, F., Pasteur, N. & Guillet, P. (1997) Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *Journal of Medical Entomology*, **34**, 664-671.
- Curtis, C.F. & Pasteur, N. (1981) Organophosphate resistance in vector populations of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **71**, 153-161.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, A.J. & Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88-95.
- Ferrari, J.A. & Georghiou, G.P. (1990) Quantitative genetic variation of esterase activity associated with a gene amplification in *Culex quinquefasciatus*. *Heredity*, **66**, 265-272.
- Finney, D.J. (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fournier, D., Bride, J.M., Hoffmann, F. & Karch, F. (1992) Acetylcholinesterase : two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 14270-14274.
- Georghiou, G.P., Metcalf, R.L. & Gidden, F.E. (1966) Carbamate resistance in mosquitoes : selection of *Culex pipiens fatigans* Wied. (= *Culex quinquefasciatus*) for resistance to Baygon. *Bulletin of the World Health Organisation*, **35**, 691-708.
- Georghiou, G.P., Pasteur, N. & Hawley, M.K. (1980) Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. *Journal of Economic Entomology*, **73**, 301-305.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., MacPhee-Quigley, K. & Taylor, P. (1990) Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7546-50.
- Khayrandish, A. & Wood, R.J. (1993) A multiple basis for insecticide resistance in a strain of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from Muheza, Tanzania, studied as resistance declined. *Bulletin of Entomological Research*, **83**, 75-86.
- Krejci, E., Duval, N., Chatonnet, A., Vincens, P. & Massoulie, J. (1991) Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6647-51.

- Magnin, M., Marboutin, E. & Pasteur, N. (1988) Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) in West Africa. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 99-104.
- Majori, G., Sabatinelli, G., Villani, F. & Petrarca, V. (1986) Studies on insecticide resistance of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in the area of Ouagadougou, Burkina Faso (West Africa). *Journal of the American Mosquito Control Association*, **2**, 305-309.
- Morton, R.A. & Singh, R.S. (1982) The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Genetics*, **20**, 179-98.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Simeon, V. & Fournier, D. (1992) Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosine 109 in *Drosophila* protein. *Neuroreport*, **3**, 39-42.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. & Fournier, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **91**, 5922-5926.
- Pasteur, N., G. Pasteur, J. Catalan, F. Bonhomme, & J. Britton-Davidian. 1988. Practical isozyme genetics. Ellis Horwood, Chichester, England.
- Pasteur, N., M. Raymond, F. Rousset, J.-B. Bergé, M. Amichot et al. 1996. Cloning and detection of insecticide resistance genes, pp. 399-419 in *The molecular Biology of Insect Disease Vectors: Method Manual*, edited by J.M. Crampton, C.B. Beard and K. Louis. Chapman, London.
- Raymond, M., Heckel, D.G. & Scott, J.G. (1989) Interactions between pesticide genes : model and experiment. *Genetics*, **123**, 543-551.
- Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P. & Pasteur, N. (1991) Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350**, 151-153.
- Raymond, M., Prato, G. & Ratsira, D. (1993a). Probit analysis of mortality assays displaying quantal response. Licence L93019. Praxème: 34680 St. Georges d'Orques, France.
- Raymond, M., Poulin, E., Boiroux, V., Dupont, E. & Pasteur, N. (1993b) Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity*, **70**, 301-307.

- Severini, C., Romi, R., Marinucci, M. & Raymond, M. (1993) Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **9**, 164-168.
- Tang, Z.H., Wood, R.J. & Cammack, S.L. (1990) Acetylcholinesterase activity in organophosphorus and carbamate resistant and susceptible strains of the *Culex pipiens* complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **37**, 192-199.
- Villani, F., White, G.B., Curtis, C.F. & Miles, S.J. (1983) Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **73**, 153-170.
- Wirth, M.C., Marquine, M., Georghiou, G.P. & Pasteur, N. (1990) Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) : Role in organophosphate resistance and linkage. *Journal of Medical Entomology*, **27**, 202-206.
- Wirth, M.C. & Georghiou, G.P. (1996) Organophosphate resistance in *Culex pipiens* from Cyprus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **12**, 112-118.
- Wood, R.J., Pasteur, N. & Sinègre, G. (1984) Carbamate and organophosphate resistance in *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) in southern France and the significance of Est 3A. *Bulletin of Entomological Research*, **74**, 677-687.
- Yébakima, A., Raymond, M., Marquine, M. & Pasteur, N. (1995) Resistance to organophosphorous insecticides in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from Martinique. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 77-82.

Table 1. Log dose-probit mortality data for susceptible strain (S-Lab) and two resistant strains (Kop F21 and Super-Car F21) with 6 organophosphates.

Insecticide	Strain	LC ₅₀	(CI ₉₅)	LC ₉₅	(CI ₉₅)	RR ₅₀	RR ₉₅
Chlorpyrifos Ethyl	S-Lab	0.0016	(0.00150-0.00166)	0.0022	(0.00209-0.00239)	--	--
	Super-Car	0.0421	(0.03781-0.04632)	0.1183	(0.09968-0.15076)	26.3	53.8
	Kop	0.5072	(0.47219-0.54818)	0.8682	(0.74436-1.16825)	317.0	394.6
Temephos	S-Lab	0.0015	(0.00141-0.00154)	0.0023	(0.00215-0.00251)	--	--
	Super-Car	0.0102	(0.00929-0.01120)	0.0274	(0.02283-0.03508)	6.8	11.9
	Kop	0.0355	(0.03389-0.03692)	0.0475	(0.04498-0.05133)	23.7	20.7
Fenitrothion	S-Lab	0.0046	(0.00419-0.00489)	0.0088	(0.00791-0.01039)	--	--
	Super-Car	0.4814	(0.44834-0.51566)	0.9666	(0.86134-1.12821)	104.7	109.8
	Kop	1.3513	(1.27933-1.41897)	2.0182	(1.87982-2.22723)	293.8	229.3
Pyraclofos	S-Lab	0.0242	(0.02239-0.02584)	0.0454	(0.04120-0.05197)	--	--
	Super-Car	0.2767	(0.25826-0.29441)	0.5461	(0.49120-0.63213)	11.4	12.0
	Kop	0.3142	(0.29556-0.33178)	0.5143	(0.47168-0.58174)	13.0	11.3
Chlorphoxim	S-Lab	0.0079	(0.00746-0.00842)	0.0139	(0.01244-0.01659)	--	--
	Super-Car	0.1471	(0.13342-0.16321)	0.4594	(0.38275-0.58078)	18.6	33.1
	Kop	0.3800	(0.34321-0.40880)	0.6439	(0.58093-0.76306)	48.1	46.3
Pirimiphos Methyl	S-Lab	0.0122	(0.01132-0.01319)	0.0267	(0.02305-0.03297)	--	--
	Super-Car	0.1842	(0.16236-0.20740)	0.4451	(0.35989-0.63737)	15.1	16.7
	Kop	0.2576	(0.24504-0.27078)	0.3921	(0.36033-0.44281)	21.1	14.7

LC_{50/95}, = Lethal concentrations in mg/l and their 95% confidence intervals in brackets

RR_{50/95} = Resistance ratio at LC_{50/95} (LC_{50/95} sample tested/LC_{50/95} of S-Lab)

Table 2. Bimolecular rate constants, k_i (\pm s.e.) for different inhibitors of AChE1 for the reference susceptible strain S-Lab and the two resistant strains Super-Car and Kop.

Strain	k_i ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$)								
	Propoxur		Eserine		Malaoxon	Paraoxon		Aldicarb	
S-Lab	145,000.00 \pm 5,000.00		15,000,000 \pm 760,000		1,200 \pm 100	160,000 \pm 10,000		6,400 \pm 150	
Kop	0.54 \pm	0.07	53,000 \pm	6,000	180 \pm 15	240 \pm	10	540 \pm	20
Super-Car	0.55 \pm	0.03	57,000 \pm	5,000	180 \pm 20	230 \pm	0	540 \pm	20

Table 3. Activity ratio of AChE1 for different substrates for the reference susceptible strain S-Lab and for the two resistant strains Super-Car and Kop.

Strain	P ^a / A ^b	B ^c / A
S-Lab	0.747 ± 0.008	0.149 ± 0.007
Kop	0.250 ± 0.008	0.099 ± 0.006
Super-Car	0.247 ± 0.005	0.096 ± 0.004

^aP = AChE1 activity using propionylthiocholine

^bA = AChE1 activity using acetylthiocholine

^cB = AChE1 activity using butyrylthiocholine

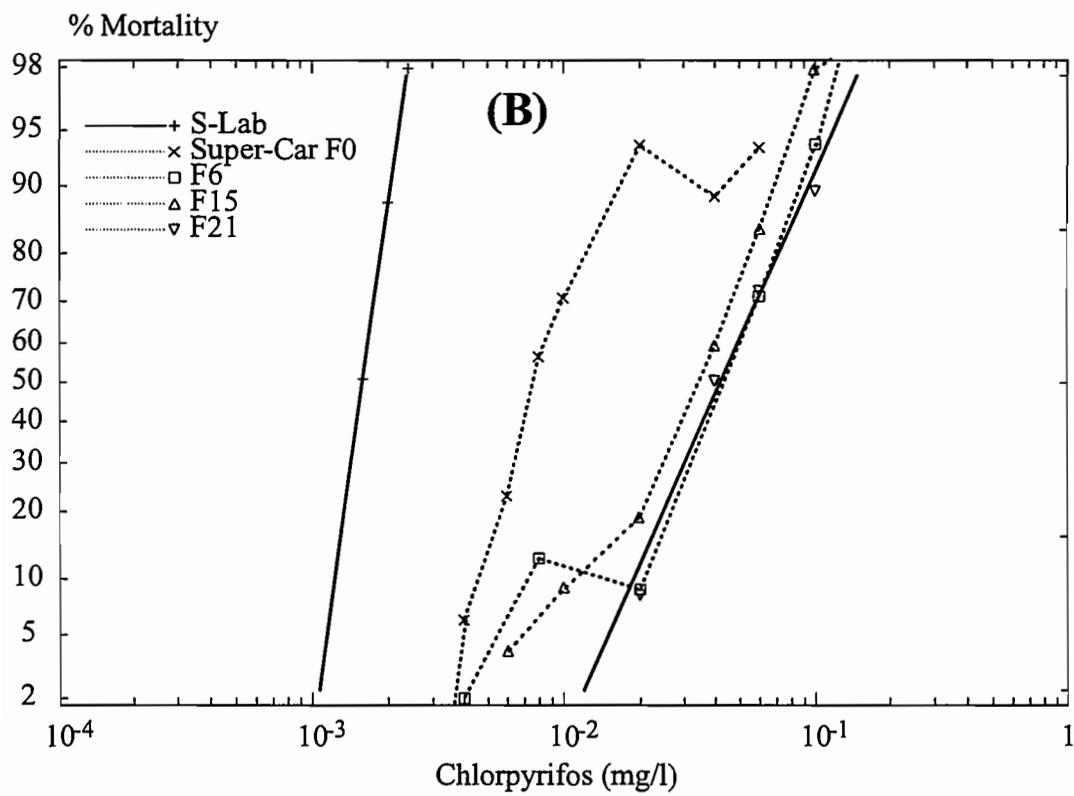
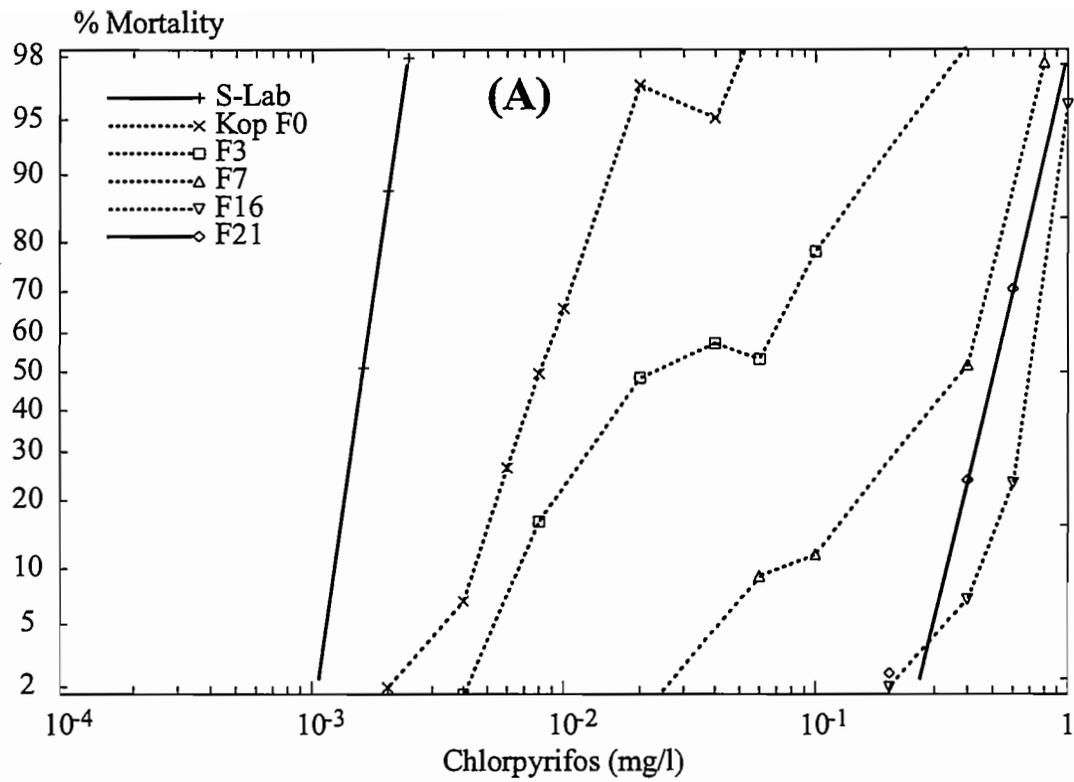
Fig. 1. Evolution of Chlorpyrifos resistance of the Kop (A) and Super-Car (B) strains of *Cx quinquefasciatus* through selection. S-Lab: susceptible reference strain.

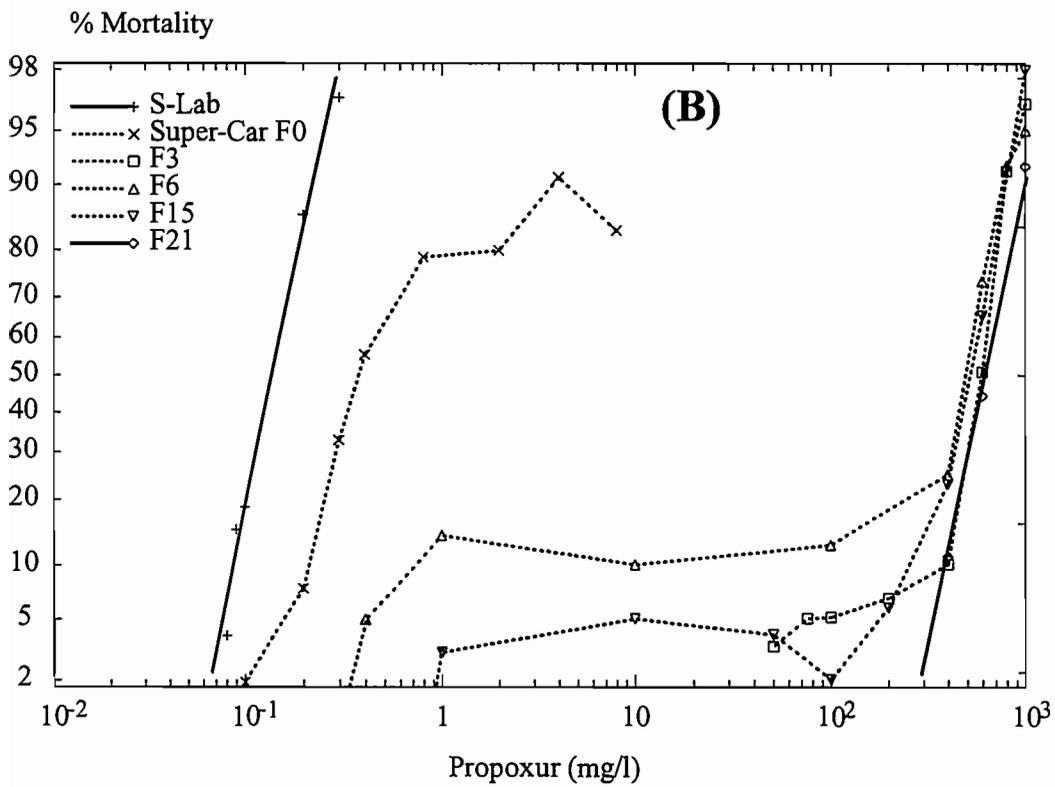
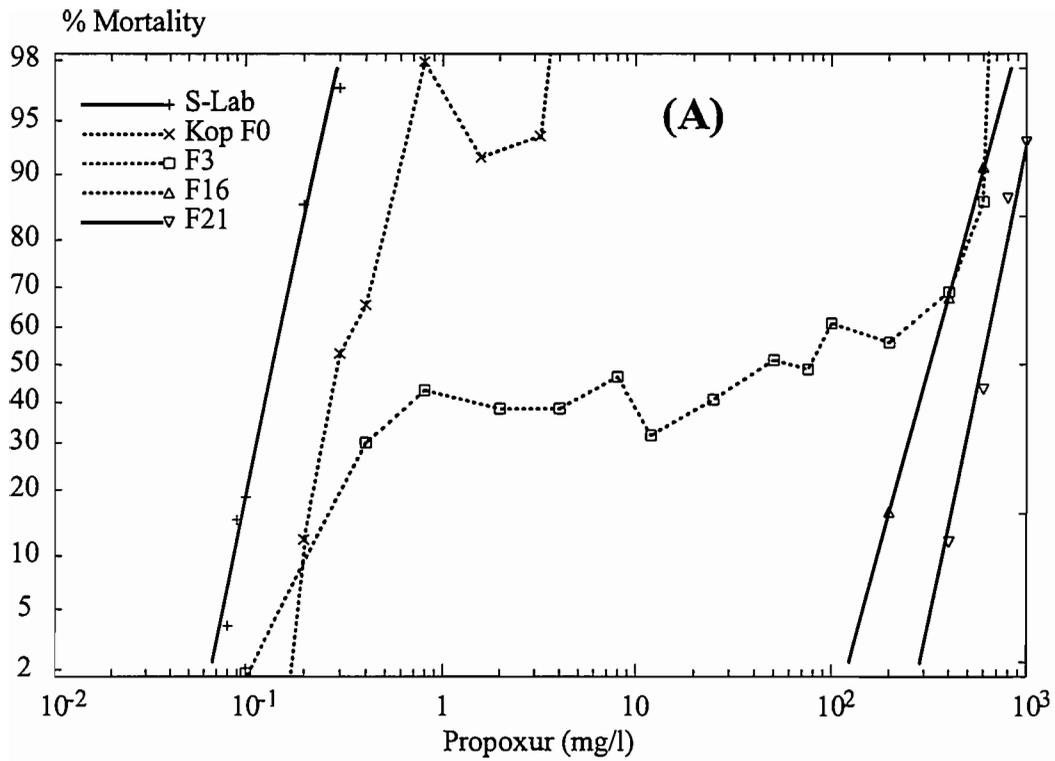
Fig. 2. Evolution of Propoxur resistance of the Kop (A) and Super-Car (B) strains of *Cx quinquefasciatus* through selection. S-Lab: susceptible reference strain.

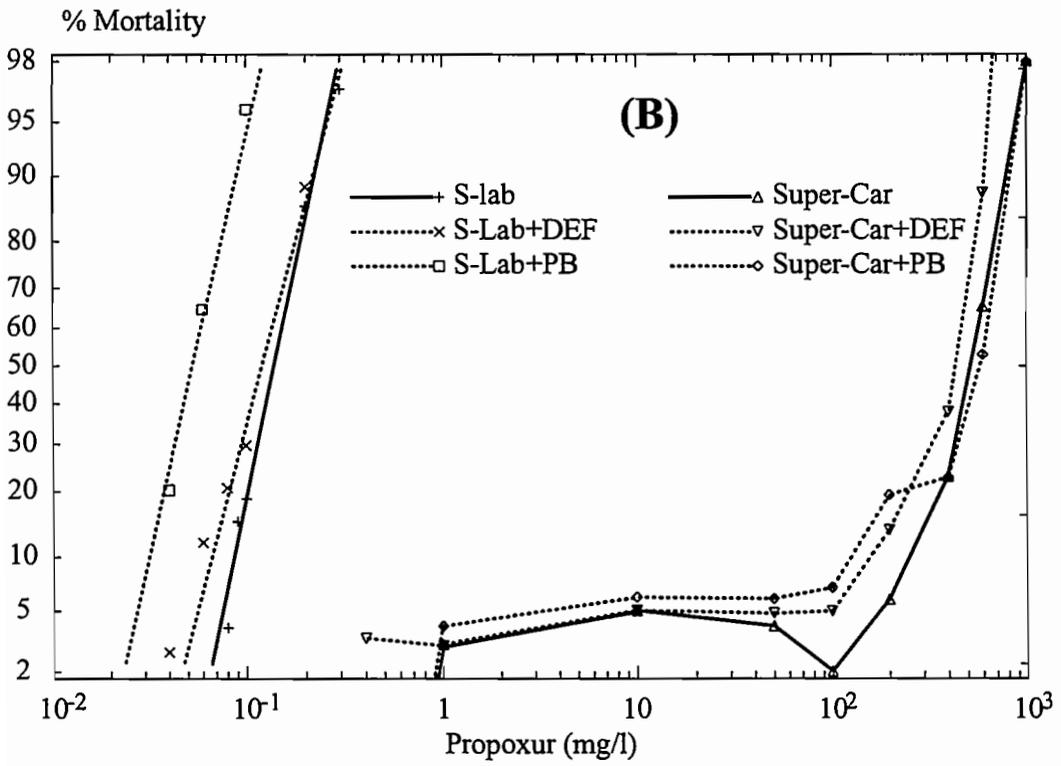
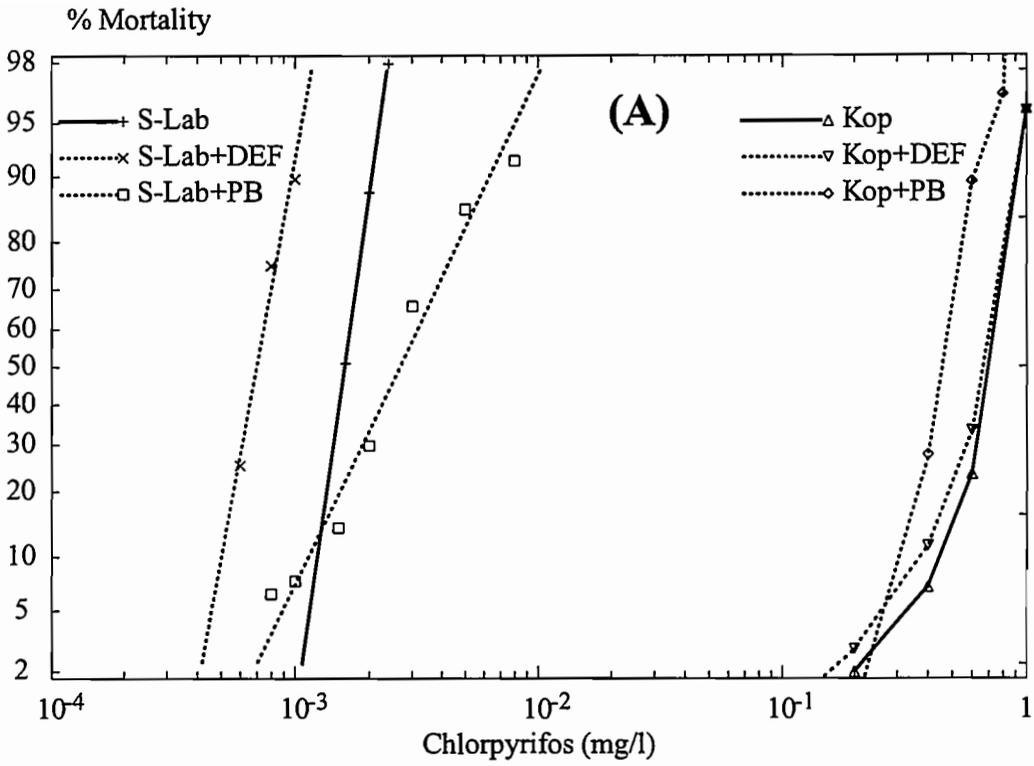
Fig. 3. Synergist modifications of concentration-mortality lines with the susceptible reference strain S-Lab and the resistant strains of *Cx quinquefasciatus* in presence of PBO and in presence of DEF. (A) Synergist effects on chlorpyrifos resistance of Kop strain F16. (B) Synergist effects on propoxur resistance of Super-Car strain F15.

Fig. 4. Evolution of organophosphate and carbamate resistance mechanisms in Kop strain. A2-B2, C2, B1 and *Ace.1^R* were indicated as frequency of resistant phenotypes. Esterases activity is indicated as nmol of α naphthol produced by min and mg of mosquito.

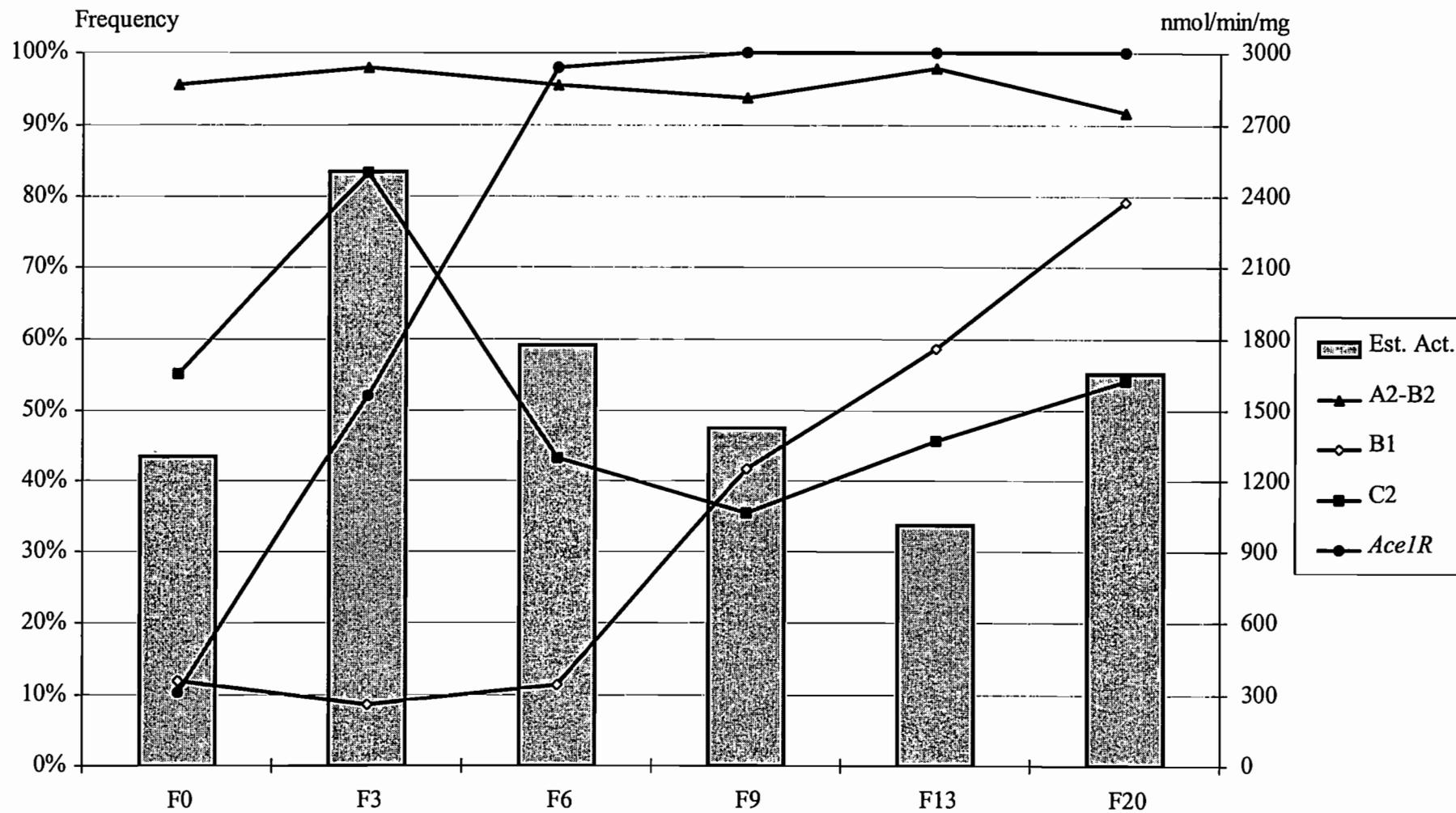
Fig. 5. Evolution of organophosphate and carbamate resistance mechanisms in Super-Car strain (see Fig. 4 for legends).



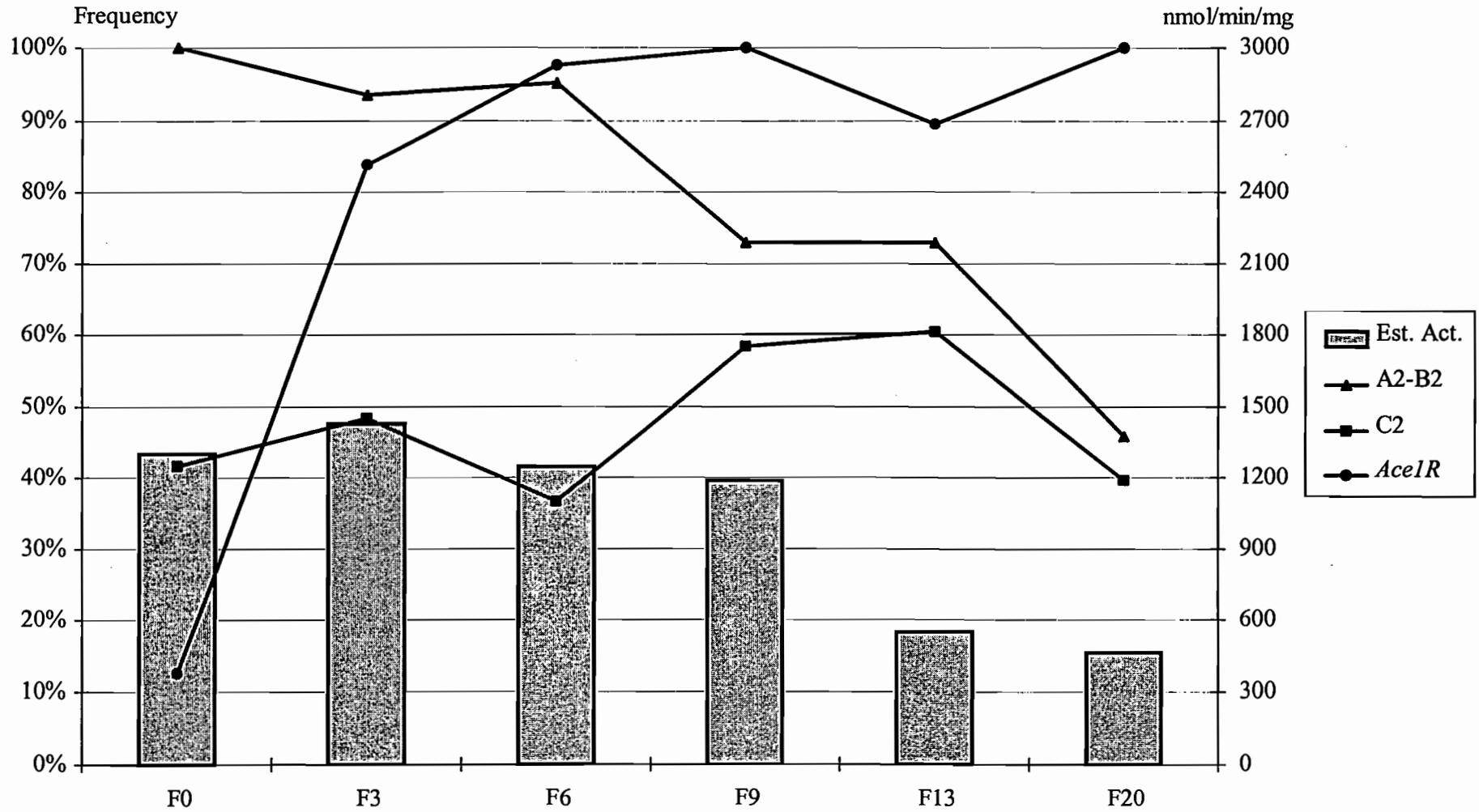




Kop



Super-Car



Article 4

Chandre F., Darriet F., Darder M., Cuany A., Doannio J.M.C., Pasteur N., Guillet P. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* from West Africa. *Medical & Veterinary Entomology*. 12: 359-366.

Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa

F. CHANDRE, F. DARRIET,* M. DARDER, A. CUANY, †
J.M.C. DOANNIO,* N. PASTEUR‡ and P. GUILLET

Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, ORSTOM, Montpellier, France, *OCCGE, Institut Pierre Richet, BP 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire, †INRA, Laboratoire de Biologie des Invertébrés, 123 Bd Meilland, 06606 Antibes, France, and ‡CNRS UMR 5554, Laboratoire de Génétique et Environnement, Institut des Sciences de l'Environnement, Université de Montpellier II (CC 065), 34095 Montpellier, France

Abstract. Pyrethroid resistance was investigated in thirty-three samples of *Culex quinquefasciatus* Say from twenty-five cities in Côte d'Ivoire and Burkina Faso. Permethrin resistance ratios at LC₅₀ ranged from 9.5- to 82-fold in Côte d'Ivoire and from 17- to 49-fold in Burkina Faso. For deltamethrin, resistance ratios were lower and ranged from nine to thirty-eight in both countries. A strain was selected with permethrin to investigate resistance mechanisms. After forty-two generations of selection, permethrin resistance level reached 3750-fold, but deltamethrin resistance remained unexpectedly unchanged. This indicated that a specific mechanism was involved in permethrin resistance. Synergist assays and biochemical tests indicated that resistance was partly due to P450-dependent oxidases. A target site insensitivity (*kdr*) was also involved, associated with DDT cross resistance and a dramatic loss of permethrin knockdown effect on adults. This resistance should be taken into consideration when planning the use of pyrethroid-impregnated materials in urban areas, as *Culex* is by far the main source of nuisance. Any failure in nuisance control due to resistance is likely to demotivate people in using impregnated materials.

Key words. *Culex quinquefasciatus*, resistance, pyrethroid, oxidases, knockdown resistance, West Africa, Burkina Faso, Côte d'Ivoire.

Introduction

Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) is a pantropical pest and urban vector of Bancroftian filariasis. Resistance to organochlorine, cyclodiene, organophosphate and carbamate insecticides is widespread and well documented for populations of this mosquito throughout the world. In contrast, only few data are available on pyrethroid resistance. The first case of pyrethroid resistance in *Cx quinquefasciatus* was obtained in California by laboratory selection of a strain with permethrin and was mainly due to a knockdown resistance (*kdr*) gene (Priester & Georgiou, 1978). *Kdr* is a common mechanism of resistance among pest insects, providing a wide spectrum of cross-resistance to DDT and pyrethroids. As a consequence, it is often stated that some species have developed

pyrethroid resistance rapidly because of DDT resistance. During the 1950s and 1960s, DDT was used massively for pest control in agriculture and against public health pest and vectors in urban as well as rural areas. In West Africa, organochlorine resistance in *Cx quinquefasciatus* developed rapidly when large-scale urban control operations were launched in large cities. DDT resistance in *Cx quinquefasciatus* was first recorded in 1958 in Côte d'Ivoire and Burkina Faso (Adam *et al.*, 1958; Hamon *et al.*, 1958) and later on in Mali (Hamon *et al.*, 1961). In 1968, twelve populations of *Cx quinquefasciatus* from seven West African countries were all found to be resistant to dieldrin and most of them also to DDT (Mouchet *et al.*, 1968). Pyrethroid resistance in West Africa was first observed in 1986 in Côte d'Ivoire (Magnin *et al.*, 1988).

We have made a widespread survey of *Cx quinquefasciatus* in West Africa, with the objective of assessing the evolution and spread of insecticide resistance genes in natural populations. Large cities of Côte d'Ivoire and Burkina Faso were surveyed, covering a wide range of biogeographical areas. Samples were collected along transects, mainly the road which runs across

Correspondence: Dr Fabrice Chandre, ORSTOM, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France. E-mail: chandre@mpl.orstom.fr

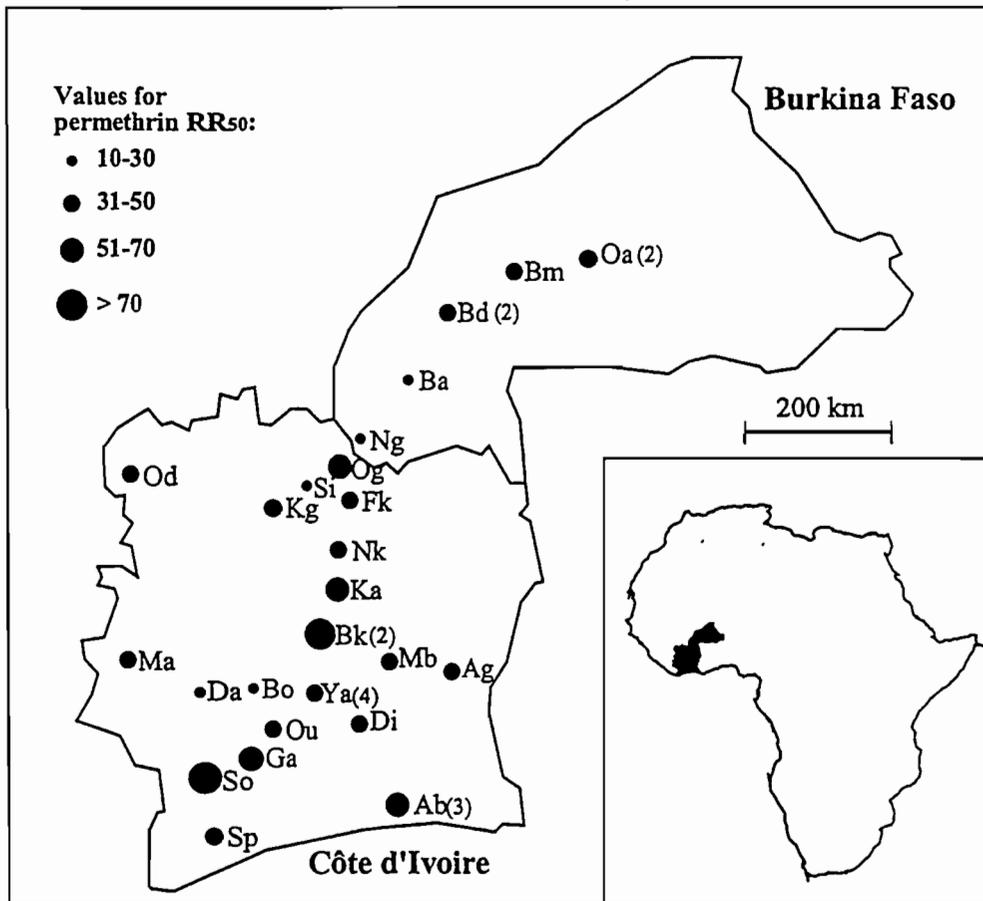


Fig. 1. Locations of the twenty-five towns surveyed for *Cx quinquefasciatus* and permethrin resistance ratios (RR_{50}) observed. Numbers of multiple samples are indicated in brackets. Abbreviations: Côte d'Ivoire: Ab, Abidjan; Ag, Abengourou; Bk, Bouaké; Bo, Bouaflé; Da, Daloa; Di, Dimbokro; Fk, Ferkessédougou; Ga, Gagnoa; Ka, Katiola; Kg, Korhogo; Ma, Man; Mb, M'bahiakro; Nk, Niakaramandougou; Od, Odienné; Og, Ouangolo; Ou, Oumé; Si, Sinématiali; So, Soubré; Sp, San Pédro; Ya, Yamoussoukro; Burkina Faso: Ba, Banfora; Bd, Bobo-Dioulasso; Bm, Boromo; Ng, Niangoloko; Oa, Ouagadougou.

Côte d'Ivoire to Burkina Faso (950 km from Abidjan to Ouagadougou). Field mosquito populations were tested systematically with organophosphates, carbamates and pyrethroids. Data on organophosphate and carbamate resistance were published previously (Chandre *et al.*, 1997) and here we report results about pyrethroid resistance.

Materials and Methods

Mosquitoes

To avoid biased sampling and/or mortality affecting the genetic composition of samples, *Cx quinquefasciatus* were collected as egg rafts in natural breeding sites. Egg rafts were transported to the laboratory on wet cotton in Petri dishes maintained at 4–10°C. Larvae were reared under standard conditions as described by Chandre *et al.* (1997). From March 1994 to June 1995, a total of thirty-three samples were collected

in twenty representative cities of Côte d'Ivoire and five of Burkina Faso (Fig. 1). In five of the largest cities, multiple collections were made to compare resistance patterns between districts. Field samples were compared to 'S-Lab', a susceptible reference strain (Georghiou *et al.*, 1966) reared and tested in the same conditions.

Resistance mechanisms were investigated using strain 'Bk-Per' derived from a resistant field sample (Bk1) which was mass selected in the laboratory at every generation. Selections were made by exposing fourth instars to permethrin concentrations, providing 60–90% mortality during 24 h.

Larval bioassays

Two pyrethroids of technical grade quality were used: 93.8% permethrin 25:75, and 99.8% deltamethrin (provided by Agrevo, Berkhamsted, U.K.). Insecticide solutions were made in ethanol 95°C and stored at 4°C for less than 2 months.

Table 1. Log dose-probit mortality data for permethrin of *Cx quinquefasciatus* samples from Côte d'Ivoire and Burkina Faso. Samples are named as in Fig. 1.

Samples S-Lab	LC ₅₀ (mg/l)		LC ₉₅ (mg/l)		RR ₅₀ -
	0.0021	(0.0019–0.0022)	0.0054	(0.0047–0.0064)	
Côte d'Ivoire					
Ab1	0.114	(0.106–0.124)	0.302	(0.258–0.370)	54
Ab2	0.137	(0.126–0.150)	0.413	(0.355–0.498)	65
Ab3	0.122*	(0.083–0.180)	0.336	(0.151–0.752)	58
Ya1	0.071	(0.063–0.080)	0.331	(0.266–0.442)	33
Ya2	0.087	(0.074–0.101)	0.546	(0.411–0.809)	41
Ya3	0.097	(0.084–0.112)	0.675	(0.496–1.031)	46
Ya4	0.073	(0.065–0.083)	0.382	(0.302–0.524)	35
Bk1	0.138	(0.117–0.166)	1.508	(0.928–3.216)	66
Bk2	0.173	(0.154–0.196)	1.033	(0.801–1.426)	82
Ka	0.112	(0.101–0.125)	0.494	(0.405–0.635)	53
Kg	0.082	(0.073–0.092)	0.426	(0.336–0.580)	39
Si	0.020	(0.012–0.028)	0.150	(0.114–0.238)	9.5
Fk	0.082	(0.072–0.093)	0.477	(0.370–0.666)	39
Nk	0.099	(0.086–0.114)	0.777	(0.562–1.208)	47
Og	0.136	(0.118–0.157)	0.886	(0.642–1.377)	65
Bo	0.050	(0.043–0.057)	0.243	(0.197–0.320)	24
Da	0.051	(0.046–0.056)	0.136	(0.119–0.162)	24
Ma	0.075	(0.050–0.110)	0.179	(0.079–0.440)	36
Od	0.065*	(0.046–0.092)	0.215	(0.104–0.450)	31
Ou	0.069	(0.049–0.097)	0.257	(0.122–0.569)	33
Ga	0.113*	(0.076–0.168)	0.724	(0.261–2.111)	54
So	0.149	(0.136–0.165)	0.445	(0.370–0.568)	71
Sp	0.103	(0.091–0.116)	0.537	(0.417–0.753)	49
Mb	0.077	(0.068–0.088)	0.430	(0.337–0.596)	37
Di	0.067	(0.062–0.072)	0.140	(0.123–0.168)	32
Ag	0.085	(0.079–0.092)	0.207	(0.177–0.257)	40
Burkina Faso					
Ng	0.048	(0.044–0.053)	0.133	(0.116–0.158)	23
Ba	0.036*	(0.013–0.101)	0.192	(0.026–1.504)	17
Bd1	0.102	(0.092–0.113)	0.347	(0.277–0.472)	49
Bd2	0.085	(0.076–0.095)	0.366	(0.297–0.483)	41
Bm	0.067*	(0.042–0.105)	0.229	(0.084–0.632)	32
Oa1	0.051	(0.043–0.059)	0.343	(0.228–0.681)	24
Oa2	0.087	(0.076–0.100)	0.442	(0.346–0.609)	41

* Rejection of linearity of log dose-probit mortality response ($P < 0.05$). LC_{50/95} = lethal concentrations and their 95% confidence intervals in brackets. RR₅₀ = resistance ratio at LC₅₀ (LC₅₀ sample tested/LC₅₀ of S-Lab).

Bioassays were made with late third and early fourth instars (4 days after hatching). Batches of twenty larvae were assayed in 99 ml of distilled water, adding one ml of insecticide solution at the required concentration. Five replicates per concentration, and five to eight concentrations, providing between 0 and 100% mortality, were used for each bioassay. Mortality was recorded after a 24-h exposure. Temperature was maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ during bioassays. Controls were made with 1 ml of ethanol and mortality never exceeded 4%.

The effect of two classical synergists, DEF (S,S,S-tributyl phosphorotrithioate; Interchim, Asnières, France), an inhibitor of esterases and glutathione-S-transferases, and PBO (piperonyl butoxide; Fluka, St-Quentin, France), an inhibitor of oxidases, was tested on the permethrin-resistant strain 'Bk-Per' after twenty generations of selection. Concentrations used were

0.008 mg/l for DEF and 1 mg/l for PBO, the maximum sub-lethal concentrations for 'S-Lab'. Larvae were exposed to synergist 4 h prior to insecticide, and maintained for 24 h in insecticide plus synergist solution.

Adult bioassays

Adult bioassays were made with the 'Bk-Per' strain to investigate possible resistance to knockdown effect of pyrethroids. Permethrin-impregnated papers were prepared according to the WHO protocol (1970), using silicone oil (Dow Corning 556) as the carrier. Impregnation was made on the basis of 3.6 mg of permethrin oil solution per cm². Four replicates of twenty-five unfed females (3–5 days old) were

Table 2. Log dose-probit mortality data for deltamethrin of *Cx quinquefasciatus* samples from Côte d'Ivoire and Burkina Faso.

Samples	LC ₅₀ (mg/l)	LC ₉₅ (mg/l)	RR ₅₀
S-Lab	0.00016 (0.00014–0.00017)	0.00045 (0.00039–0.00055)	–
Côte d'Ivoire			
Ab1	0.0059 (0.0054–0.0064)	0.0186 (0.0158–0.0231)	37
Ab2	0.0060 (0.0056–0.0065)	0.0156 (0.0137–0.0185)	38
Ab3	0.0060 (0.0056–0.0064)	0.0125 (0.0111–0.0148)	38
Bk1	0.0054 (0.0049–0.0060)	0.0173 (0.0146–0.0213)	34
Bk2	0.0057 (0.0052–0.0062)	0.0175 (0.0150–0.0215)	36
Ka	0.0047 (0.0043–0.0051)	0.0113 (0.0099–0.0135)	29
Kg	0.0044 (0.0040–0.0049)	0.0177 (0.0147–0.0224)	28
Bo	0.0037 (0.0033–0.0041)	0.0107 (0.0092–0.0132)	23
Da	0.0046 (0.0042–0.0051)	0.0139 (0.0117–0.0178)	29
Ma	0.0015 (0.0009–0.0027)	0.0043 (0.0017–0.0116)	9.4
Od	0.0039 (0.0036–0.0043)	0.0096 (0.0085–0.0113)	24
Ga	0.0028 (0.0025–0.0032)	0.0095 (0.0079–0.0121)	18
Sp	0.0034 (0.0034–0.0039)	0.0083 (0.0073–0.0099)	21
Burkina Faso			
Bd1	0.0029 (0.0026–0.0032)	0.0068 (0.0057–0.0089)	18
Oa1	0.0039 (0.0031–0.0045)	0.0234 (0.0142–0.0556)	28

LC_{50/95} = lethal concentrations and their 95% confidence intervals in brackets. RR₅₀ = resistance ratio at LC₅₀ (LC₅₀ sample tested/LC₅₀ of S-Lab).

exposed for 1 h to impregnated papers in WHO test kits maintained in vertical position. The knockdown rate (mosquitoes lying on their side or unable to fly) was checked periodically during insecticide exposure. After exposure, mosquitoes were kept in observation tubes and supplied with 10% honey solution food. Mortality was checked 24 h after exposure. Control tests used adult females exposed to untreated papers and mortality never exceeded 5%.

P450-dependent oxidase assays

Preliminary investigations of P450-dependent monooxygenase activities were carried out with the 'Bk-Per' and 'S-Lab' strains using a microplate assay developed for *Drosophila* (De Sousa et al., 1995). This microfluorimetric method measured the ethoxycoumarin-deethylase (Ecod) activity in single individuals. Adult mosquitoes were anaesthetized using carbon dioxide and killed by separating head, thorax and abdomen. For each mosquito, the body parts were incubated together in a well of a microtitre plate containing 100 µl of phosphate buffer (pH = 7.2) with 7-ethoxycoumarin 0.04 mM. After 4 h at 30°C, production of 7-hydroxycoumarin was stopped by adding 100 µl of glycine-ethanol buffer (pH = 10.4). Microtitre plates were read on a Dynatech fluorimeter (Fluorolite 1000) fitted with 390 nm excitation and 450 nm emission filters. Fluorescence values were adjusted to a standard curve for 7-hydroxycoumarin, to evaluate the amount of this metabolite produced by each individual. Comparisons were based on the means of 7-hydroxycoumarin in picograms produced by mn and mg of mosquito.

Data analysis

Mortality and knockdown data were analysed using a log-probit software (Raymond et al., 1993), based on Finney

(1971). Samples were considered as having the same susceptibility when parallelism of their probit lines was not rejected ($P > 0.05$) and the ratio did not differ significantly from the value 1. As multiple simultaneous tests were made, levels of significance of each test were adjusted to take others into account (Rice, 1989).

Results

Pyrethroid resistance in field samples

All samples of *Cx quinquefasciatus* collected in Côte d'Ivoire and Burkina Faso were resistant to permethrin (Table 1, Fig. 1). In Côte d'Ivoire, resistance ratios at LC₅₀ (RR₅₀) ranged from 9.5- to 82-fold, but most (21/26) were within the narrower range from 31- to 66-fold, indicating homogeneous levels of resistance among samples. In Burkina Faso, permethrin RR₅₀ ranged from 17 to 49. The samples were also resistant to deltamethrin (Table 2), but to a lower extent (RR₅₀ from 9.4 to 38). All dose-mortality curves (except five with permethrin) were well fitted by a straight line ($P > 0.05$), suggesting that samples were usually homogeneous for permethrin and deltamethrin resistance.

Multiple samples were tested from three cities of Côte d'Ivoire (Ab, Bk, Ya) and two cities of Burkina Faso (Bd, Oa). For *Cx quinquefasciatus* from each city, permethrin probit lines were parallel ($P > 0.8$) and the ratios of lethal concentrations between districts (after slope correction) were not significantly different from 1, except for Oa. This indicates that there was no significant difference in permethrin resistance level within cities. A similar observation was made in Bk and Ab with deltamethrin.

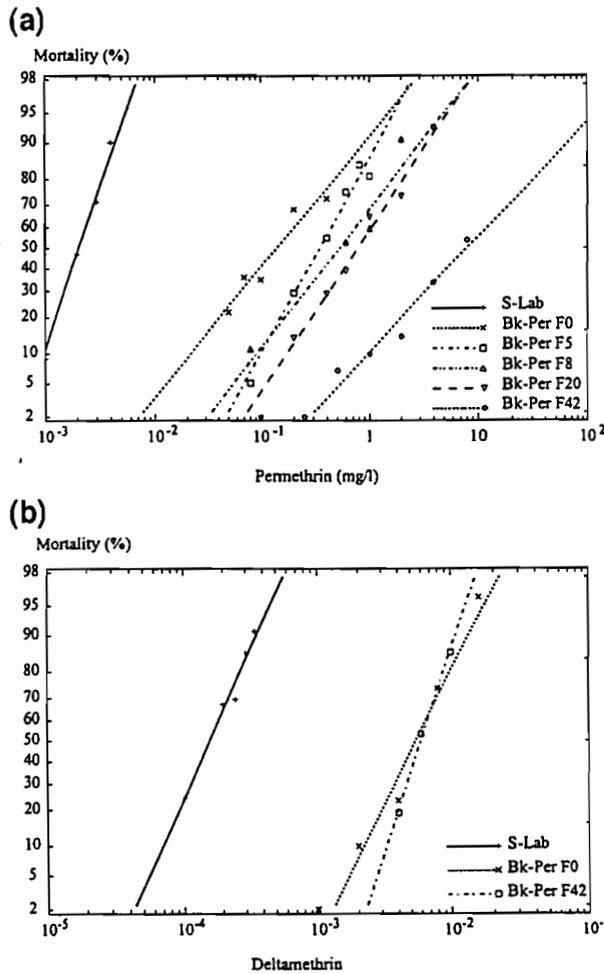


Fig. 2. Evolution of (a) permethrin and (b) deltamethrin resistance of the 'Bk-Per' strain of *Cx quinquefasciatus* through permethrin selection. 'S-Lab': susceptible reference strain.

Characterization of the resistance mechanisms in the 'Bk-Per' strain

The initial LC_{50} of 'Bk-Per' strain (sample Bk1) was 0.138 mg/l with permethrin ($RR_{50} = 66$). Selection with permethrin gradually increased the resistance level to 370-fold and 3750-fold after twenty and forty-two generations, respectively (Fig. 2a). During selection, log dose–probit mortality responses were statistically fitted by straight lines ($P > 0.05$), indicating that resistance may be polyfactorial.

The initial deltamethrin LC_{50} of 'Bk-Per' was 0.0054 mg/l ($RR_{50} = 34$). After forty-two generations of permethrin selection, surprisingly, the deltamethrin resistance level ($LC_{50} = 0.0059$ mg/l) had not changed significantly (Fig. 2b). Pyrethroid resistance in 'Bk-Per' was associated with a high level of DDT resistance in larvae of the twentieth generation ($RR_{50} > 100$, data not shown).

Synergism studies were made with the twentieth generation of 'Bk-Per'. The use of PBO significantly decreased tolerance to permethrin in both strains 'S-Lab' and 'Bk-Per' (Fig. 3a).

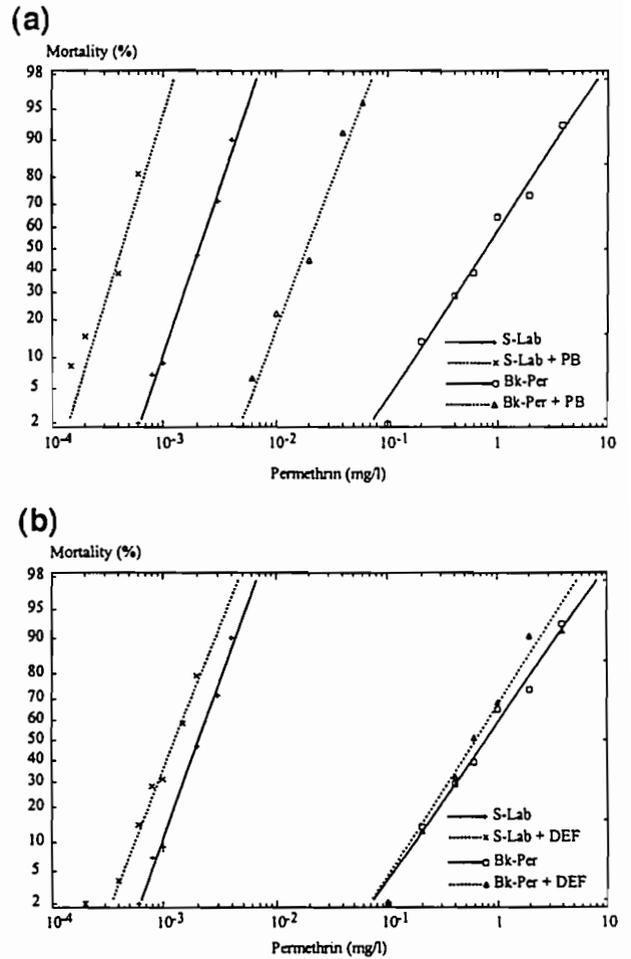


Fig. 3. Synergist modification of concentration–mortality lines with the susceptible reference strain 'S-Lab' and the resistant strain 'Bk-Per' of *Cx quinquefasciatus* in the presence of (a) PBO and (b) DEF.

The higher decrease of permethrin LC_{50} for 'Bk-Per' (41-fold) than for 'S-Lab' (fivefold), indicated an increase of oxidative metabolism. However, resistance was incompletely synergised and the RR_{50} remained high (39-fold) when using PBO. The use of DEF did not change the toxicity of permethrin for strain 'Bk-Per', indicating that esterases were not involved (Fig. 3b).

P450-dependent oxidase assays

Preliminary investigations of Ecod activities were carried out with about fifty males and thirty females of the two strains (Table 3). The amount of 7-hydroxycoumarin produced by male and female mosquitoes was significantly higher in 'Bk-Per' than in 'S-Lab' (ANOVA, $P < 0.01$). For each strain, Ecod activity in females was also significantly higher than in males (ANOVA, $P < 0.05$).

Adult bioassays

The high resistance level observed in larvae of the 'Bk-Per' strain was associated with decreased mortality of adults exposed

to permethrin impregnated papers (Table 4). After 1 h of exposure to the WHO diagnostic concentration for permethrin (0.25%), the mortality of adults was 61% for 'S-Lab' vs. 3% for 'Bk-Per'. With a dose tenfold higher (2.5%), the mortality reached 98% in 'S-Lab' but remained low in 'Bk-Per' (13%). Percentages of mosquitoes knocked down by different exposure times were analysed with log-probit units to estimate the Kd_{50} and Kd_{95} times (Table 4). Data were well fitted by a straight line ($P > 0.05$). At 0.25%, there was no knockdown of the 'Bk-Per' strain, whereas the time of Kd_{50} for 'S-Lab' was 39 min. At higher dosage (2.5%), Kd_{50} time was tenfold longer in 'Bk-Per' than in 'S-Lab'.

Discussion

High levels of pyrethroid resistance were observed in all thirty-three samples of *Cx quinquefasciatus* collected from Côte d'Ivoire and Burkina Faso, suggesting that they had been submitted to strong insecticide selection pressure under field conditions. Attempts made to correlate resistance levels and areas where pyrethroids are widely used in agriculture were not conclusive. Because no organized control campaign against *Culex* based on pyrethroids has been undertaken so far in both countries, it is likely that selection resulted mainly from the domestic use of pyrethrins and pyrethroids in aerosols, coils and flit sprays. This selection pressure is likely to be fairly homogeneous in different districts within cities, which might explain why resistance levels were quite similar. The similar conclusion was reached for the same cities in a study of organophosphate and carbamate resistance (Chandre et al., 1997).

Table 3. ECOD activities of adults of *Cx quinquefasciatus* for a susceptible reference strain (S-Lab) and a resistant strain (Bk-Per).

Strain	Sex	7-hydroxycoumarin (pg/min/mg) \pm CI ₉₅	n
S-Lab	Female	37.2 \pm 6.5	31
	Male	15.9 \pm 2.8	52
Bk-Per	Female	59.9 \pm 12.9	29
	Male	40.3 \pm 6.4	55

CI₉₅ = 95% confidence intervals. n = number of mosquitoes assayed.

Table 4. Comparison of knockdown time and mortality for permethrin with a susceptible reference strain (S-Lab) and a resistant strain (Bk-Per) of *Cx quinquefasciatus*.

	KDT ₅₀	CI ₉₅	KDT ₉₅	CI ₉₅	Mortality (%)
Permethrin 0.25%					
S-Lab	38.7	35.7–41.8	88.1	77.1–105.3	61
Bk-Per	No kd	–	No kd	–	3
Permethrin 2.5%					
S-Lab	10.6	9.8–10.7	24.5	23.1–26.3	98
Bk-Per	108.7	97.1–127.8	287.2	220.2–426.8	13

KDT_{50/95} = knockdown time in minutes for 50 or 95% of adult mosquitoes after one hour of exposure to permethrin-impregnated papers in WHO test kits. CI₉₅ = 95% confidence intervals.

Already in 1988, a sample of *Cx quinquefasciatus* collected in Bouaké (i.e. the Bk samples of the present study) showed cross-resistance between deltamethrin and DDT (Magnin et al., 1988). That population was heterogeneous for deltamethrin resistance with a RR₅₀ of 14-fold. Those authors showed that resistance was due to cytochrome P450 oxidases, then named mixed function oxidases, and to an unsynergised component, probably a target site mutation. Since 1988, the deltamethrin resistance level has more than doubled to RR₅₀ \approx 35 and populations appeared homogeneous, indicating an increase in the frequency of resistance genes. The role of P450 oxidases was confirmed by bioassays in presence of PBO and by measuring the Ecod activity.

The incomplete synergism of PBO and the absence of DEF effect on larval mortality indicated the possible involvement of a non-detoxicative component, such as target site insensitivity. This was investigated by studying resistance to the knockdown effect of permethrin on unfed female adult *Cx quinquefasciatus*. The use of knockdown time for resistance detection (Privora, 1975) is a good indicator of resistance in mosquitoes using WHO test cones (Kang et al., 1995) or WHO test tubes (Elissa et al., 1993; Chandre et al., in press). The complete loss of knockdown from 0.25% permethrin exposure and the increase of knockdown times with 2.5% permethrin indicated the presence of a *kdr*-type mechanism in the 'Bk-Per' strain, consistent with the high level of DDT resistance in larvae (data not shown).

In several insects, *kdr* is associated with a single mutation on the sodium channel sequence coding for the target site of pyrethroids and DDT, e.g. the housefly *Musca domestica* (Williamson et al., 1996), the cockroach *Blattella germanica* (Miyazaki et al., 1996) and *Anopheles gambiae*, the main malaria vector in Africa (Martinez-Torres et al., 1997). A preliminary investigation of *Cx quinquefasciatus* indicates that the same mutation is also present in the resistant 'Bk-Per' strain (Martinez-Torres, pers. comm.).

Usually, when a resistant strain is selected with an insecticide, the resistance extends to other compounds of the same class of insecticides. For *Cx quinquefasciatus* this was observed with pyrethroids in a Californian strain (Priester & Georghiou, 1980; Halliday & Georghiou, 1985). Unexpectedly, permethrin selection of our 'Bk-Per' strain did not affect its resistance level to deltamethrin, suggesting that permethrin resistance was partly governed by a specific factor. This is an unusual

phenomenon. In one case, decreased sensitivity of the central nervous system to permethrin, but not to cypermethrin, was observed in a resistant strain of *Spodoptera littoralis* (Gammon, 1980). A strain of *Cx quinquefasciatus* from Saudi Arabia was found to be resistant to DDT and permethrin, but electrophysiological testing for nerve insensitivity using lambda-cyhalothrin revealed no evidence of *kdr* (Amin & Hemingway, 1989). Further investigations on this strain confirmed the presence of a target site insensitivity which was selective to some but not all pyrethroids (Hemingway, pers. comm.). Further studies are needed to identify which mechanism, oxidases or *kdr*, provided specific resistance in 'Bk-Per' strain.

Although the domestic use of pyrethroids for pest control may be considered as the most likely cause of the resistance in *Cx quinquefasciatus* observed in this study, it may also have originated partly from DDT selection pressure during past decades. As was DDT resistance (Mouchet *et al.*, 1968), pyrethroid resistance is probably widely distributed throughout West Africa. This resistance should be taken into consideration when planning the use of pyrethroid-impregnated materials for malaria vector control in urban areas. Impregnated bednets are an important new tool recommended by the WHO for malaria prevention but, to be efficient, the active participation of people at community level is required. In urban areas, without a significant impact on mosquito nuisance caused essentially by *Cx quinquefasciatus*, there is a risk that bednet programmes will be disregarded by the local people. In this regard, we think it necessary to evaluate the impact of *Cx quinquefasciatus* resistance on the efficacy of impregnated materials. Nuisance mosquito control by impregnated bednets may not have the intended efficacy because of pyrethroid resistance, in addition to the innate tolerance of *Culex* when exposed to residual insecticide deposits (Brown & Pal, 1973), possibly due to the special empodium beneath *Culex* tarsi. Therefore, it may be wise to supplement the implementation of bednet programmes by *Culex* control measures based on larviciding and sanitation in urban areas.

Acknowledgements

We thank Agrevo for providing technical insecticides. We are grateful to F. Fumoux (Director of Centre Muraz, Bobo-Dioulasso) for his helpful support in Burkina Faso, R. N'guessan and B. Salou for mosquito rearing and technical assistance, S. Ouedraogo, A. Cisse, B. Koffi, A. Konate, and N. Chandre for technical assistance, and all staff members from IPR and ORSTOM in Bouaké. This study was supported, in part, by OCCGE, ORSTOM, and MESR (Grant no. 92-058; ACC-SV3 no. 95.03.037).

References

- Adam, J.P., Hamon, J. & Chevalier, J. (1958) Observations complémentaires sur la résistance aux insecticides chez les moustiques de la région d'Abidjan (Basse Côte-d'Ivoire). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **51**, 662–666.
- Amin, A.M. & Hemingway, J. (1989) Preliminary investigation of the mechanisms of DDT and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from Saudi Arabia. *Bulletin of Entomological Research*, **79**, 361–366.
- Brown, A.W.A. & Pal, R. (1973) *Insecticide Resistance in Arthropods*. 2nd edn. World Health Organization Monograph no. 38. 491 pp.
- Chandre, F., Darriet, F., Doannio, J.M.C., Rivière, F., Pasteur, N. & Guillet, P. (1997) Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from West Africa. *Journal of Medical Entomology*, **34**, 664–671.
- Chandre, F., Darriet, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. & Guillet, P. (in press) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bulletin of the World Health Organisation*.
- De Sousa, G., Cuany, A., Brun, A., Amichot, M., Rahmani, R. & Bergé, J.B. (1995) A microfluorometric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Analytical Biochemistry*, **229**, 86–91.
- Elissa, N., Mouchet, J., Rivière, F., Meunier, J.Y. & Yao, K. (1993) Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **73**, 291–294.
- Finney, D.J. (1971) *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Gammon, D.W. (1980) Pyrethroid resistance in a strain of *Spodoptera littoralis* is correlated with decreased sensitivity of the CNS *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **13**, 53–62.
- Georghiou, G.P., Metcalf, R.L. & Gidden, F.E. (1966) Carbamate resistance in mosquitoes: selection of *Culex pipiens fatigans* Wied. (= *Culex quinquefasciatus*) for resistance to Baygon. *Bulletin of the World Health Organisation*, **35**, 691–708.
- Halliday, W.R. & Georghiou, G.P. (1985) Cross-resistance and dominance relationships of pyrethroids in a permethrin-selected strain of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, **78**, 1227–1232.
- Hamon, J., Eyraud, M., Diallo, B., Dyemkourma, A., Bailly-Choumara, H. & Ouanou, S. (1961) Les moustiques de la République du Mali (Dipt. Culicidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, **130**, 95–129.
- Hamon, J., Eyraud, M., Sales, S. & Adam, J.P. (1958) Observations sur le niveau de sensibilité au DDT, au Dieldrin et au HCH de *Culex pipiens* ssp. *fatigans* dans la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta, Afrique Occidentale Française. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **51**, 393–404.
- Kang, W., Gao, B., Jiang, H., Wang, H., Yu, T., Yu, P., Xu, B. & Curtis, C.F. (1995) Test for possible effects of selection by domestic pyrethroids for resistance in culicine and anopheline mosquitoes in Sichuan and Hubei, China. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**, 677–684.
- Magnin, M., Marboutin, E. & Pasteur, N. (1988) Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 99–104.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. & Pauron, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, **7**, 179–184.
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y. & Matsumura, F. (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics*, **252**, 61–68.

- Mouchet, J., De Jardin, J. & Subra, R. (1968) Sensibilité aux insecticides de *Culex pipiens fatigans* en Afrique de l'Ouest. *Médecine Tropicale*, **28**, 374–394.
- Priester, T. & Georghiou, G.P. (1978) Induction of high resistance to permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Economic Entomology*, **71**, 197–200.
- Priester, T.M. & Georghiou, G.P. (1980) Cross-resistance spectrum in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Pesticide Science*, **11**, 617–624.
- Privora, M. (1975) Use of KT 50 for orientative evaluation (screening) of sensitivity of flies to insecticides. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, **19**, 184–194.
- Raymond, M., Prato, G. & Ratsira, D. (1993) *Probit Analysis of Mortality Assays Displaying Quantal Response*. Licence L93019. Praxème: 34680 St. Georges d'Orques, France.
- Rice, W.R. (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- WHO (1970) *Résistance aux insecticides et lutte antivectérielle. Dix-septième rapport du comité OMS d'experts des Insecticides*. Technical Report Series no. 443. 306 pp. World Health Organization, Geneva.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. & Devonshire, A.L. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics*, **252**, 51–60.

Accepted 26 April 1998

Article 5

Chandre F., F. Darriet, L. Manga, M. Akogbeto, O. Faye, J. Mouchet, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bulletin of the World Health Organization*. 77: sous presse.

STATUS OF PYRETHROID RESISTANCE IN ANOPHELES GAMBIAE S.L.

F. Chandre¹, F. Darriet², L. Manga³, M. Akogbeto⁴,

O. Faye⁵, J. Mouchet⁶, P. Guillet⁷

¹ Research Scientist, ORSTOM, Lab. Lutte contre les Insectes Nuisibles, WHO Collaborating Centre, BP5045, 34032 Montpellier cedex 1, France. Author to whom correspondence should be addressed.

² Research Engineer, OCCGE, Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire.

³ Research Scientist, OCEAC, Lab. Paludisme, Yaounde, Cameroon.

⁴ Professor, OCCGE, Centre de Recherches Entomologiques, Cotonou, Bénin.

⁵ Professor, Université CAD, Lab. de Paludologie, Dakar, Senegal.

⁶ Honorary Research Inspector, ORSTOM, Paris, France.

⁷ Research Director, ORSTOM, Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles, WHO Collaborating Centre Montpellier, France.

Introduction

Vector control is an important component of the WHO global strategy for malaria control. The objective is to break the transmission of the parasite using indoor residual spraying or pyrethroid impregnated materials (bednets and/or curtains). Pyrethroids are preferably used for the impregnation because they are highly effective and fast acting insecticides with a strong excito-repellent effect on mosquitoes.

During the Global Malaria Eradication Programme (in the 50-60's), dieldrin resistance, involving a specific resistance mechanism (GABA receptors), was recorded among most of Anopheles gambiae s.l. populations in Africa. In contrast, only a limited number of DDT resistance cases have been so far recorded in Africa. The first one in An. gambiae s.s. was observed in 1967 in Bobo Dioulasso (Burkina Faso) and attributed to the use of DDT against cotton pests^a (1, 2, 3). Soon after it was also observed in An. arabiensis from Senegal (1). DDT resistance can be due either to a specific detoxification mechanism (glutathione-S-transferase or GST) or to a nerve insensitivity resulting from a modification of the target site (sodium channel). The latter, under the dependence of kdr gene reduces both knockdown and lethal effects of DDT. In West Africa, it induces a cross resistance to pyrethroids which depends also on a kdr mutation (4). On the contrary, in Zanzibar DDT resistance induced by a GST did not cross with pyrethroids (5).

Since the 70's pyrethroids have been extensively used in urban areas (domestic coils and aerosols) as well as in rural areas for agriculture. In both cases, the selection pressure exerted on An. gambiae s.l. populations was not negligible. The first case of pyrethroid resistance in An. gambiae s.l. was recorded in Bouake (Côte d'Ivoire), and was found to have

been selected by the domestic use of aerosols (6). Later on, a reduced susceptibility was observed in a Kenyan area where permethrin impregnated bednets were used^b (7). However, in the Gambia, no change in the pyrethroid susceptibility of An. gambiae s.s. occurred along with an impregnated bednet project (8).

Considering the pyrethroid resistance observed at Bouake and the current prospects for extended use of impregnated materials, surveys were carried out in Africa through an informal collaboration network. The objectives were first to confirm the resistance recorded in Bouake and delimit its extension outside this city, as well as to obtain more information on the pyrethroid susceptibility status of An. gambiae s.l. in other countries.

Materials and methods

- Tested materials were harvested in 6 countries, including (Fig.):

Benin: Cotonou,

Botswana: Sebina,

Burkina Faso: Kou Valley (near Bobo Dioulasso),

Cameroon: Yaounde,

Côte d'Ivoire: Abidjan, Bouaké, Daloa, Kafine, Katiola, Korhogo, Odienne, Tai, Yao Koffikro,

Senegal: Dakar.

^a **Hamon J et al.** Présence dans le sud de la Haute-Volta d'une population d'*Anopheles gambiae* "A" résistante au DDT. WHO unpublished document WHO/VBC 68.75, 1968.

^b **Beach R.** International vector resistance testing: Highlights. Sixty-third annual meeting of the American Mosquito Control Association, Utah, USA, March 23-27 1997.

Most of the tests were carried out with non blood-fed, 2 to 4 days old females emerged from field collected larvae or from F1 of females collected in the field. Only in Cotonou, engorged wild caught females were directly tested. All the specimens were An. gambiae s.s. except at Dakar and Sebina where it was An. arabiensis (determined when possible by PCR). A susceptible reference strain of An. gambiae s.s. from Kisumu was used as control.

- Resistance tests

WHO test kits for adult mosquitoes were used (9). Impregnated papers were prepared in our laboratory using silicone oil (Dow Corning 556) with technical deltamethrin and 25/75 permethrin active ingredient samples (kindly provided by Agrevo). Impregnations were made on the basis of 3.6 mg of 0.25 % (weight/volume) permethrin oil solution per cm² and 0.025% for deltamethrin (WHO diagnostic concentration). Some tests were carried out with DDT 4%. The exposure time was 60 min in tube in normal vertical position. In addition to mortality after 24 hr observation time, the number of knockdown (KD) mosquitoes in tubes was recorded 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 min after the beginning of the exposure. Knockdown time (KDT50 and KDT95) was calculated using a log time-probit model with a software (10) based on Finney (11).

Results

- Mortality

The mortality observed at the permethrin diagnostic concentration of 0.25% (proposed by WHO) was rarely 100%, even for susceptible strain (Tab. 1). On the contrary, 100% mortality for susceptible strain was systematically obtained with diagnostic concentration of

deltamethrin at 0.025% and DDT at 4%. Therefore, we have considered as resistant the samples with less than 70% of mortality with permethrin 0.25% and less than 95 % for deltamethrin 0.025%.

Permethrin resistance was detected in Cotonou (Benin), Kou Valley (Burkina Faso) and several localities from Côte d'Ivoire (Tab. 1) including Bouake where it was already reported in 1993. Normal susceptibility was found in Yaounde (Cameroon), in Dakar (Senegal) and Sebina (Botswana). The last two records were dealing with An. arabiensis.

Deltamethrin resistance was observed in four out the six populations tested (Cotonou, Tai, Korhogo, Yao Koffikro).

- Knockdown

In most samples, the relationship between rate and log exposure time was linear. In resistant samples the KDT50 and KDT95 (Tab. 2) increased strongly up to nearly a complete loss of kd effect for the most resistant ones (Cotonou, Korhogo, Yao Koffikro). More interesting is the significant increase of respectively 2 fold and 2-4 fold in KDT50 and KDT95 in some field samples considered as susceptible according to their mortality records. In Abidjan, a higher increase in KDT95 was likely to result from an heterogeneity of the sample with a few specimens without KD.

Discussion

According to our results, the discriminative concentration of 0.25% for permethrin proposed by WHO is obviously too low for An. gambiae s.l. In the Gambia for instance, a mortality of only 91.5% was recorded in a population considered as susceptible (8). It would

be better to use a higher concentration, either 0.5% or 1%. On the contrary, for deltamethrin the concentration of 0.025% seems to be correct. The right diagnostic concentration for all pyrethroids should be determined for each mosquito species of medical importance. The time during which impregnated papers retain their full efficacy should also be investigated.

In addition to the use of mortality criterion, the KDT is a good indicator for the early detection of decreased susceptibility. This parameter is very easy to measure and no additional equipment besides the WHO test kit is necessary. KDT has been considered as a criterion for susceptibility/resistance for a long time (6, 12, 13). Thus it could be envisaged to systematically include the KDT measurement in monitoring programmes for mosquito insecticide resistance because it is a first level information on the possible involvement of a *kdr* gene. In addition, the *kdr* gene in *An. gambiae* s.s. can now be detected from single mosquito using molecular diagnostic by PCR (4).

Increase in KDT is stronger with permethrin than with deltamethrin. In mildly resistant populations, such as Kou Valley, KDT increased 4 to 5 folds with permethrin but only 1.5 to 2 folds with deltamethrin. In highly resistant populations displaying a complete loss of *kd* effect for permethrin, KDT₅₀ for deltamethrin was increased by only 3.5 fold and KDT₉₅ by 6 to 8 fold. Therefore, permethrin is a better indicator for an early detection of *kdr* based pyrethroid resistance. The strong decrease of mortality with deltamethrin in populations displaying a very high permethrin resistance suggests that *kdr* gene confers a cross resistance to various pyrethroids.

This large scale survey indicated that resistance of *An. gambiae* s.s. to pyrethroids is already developing in wide areas of West Africa. It recovers previous DDT resistance areas which is consistent with the fact that pyrethroid resistance has been inherited from it.

Possibly, the resistance level has been increased by the use of pyrethroids in agriculture and domestic hygiene. This pessimistic scenario should be temperate by the full susceptibility kept by anopheline populations in Gambia (8) and China (12). However, the main use of pyrethroids is not for malaria control but for agriculture purposes and on a lesser extent for domestic hygiene. These selection pressures against Anopheles populations are almost impossible to control. It is likely that the current status of resistance will evolve regardless of specific use of pyrethroids in the framework of organised and properly managed malaria control campaigns.

Conclusion

Even if pyrethroid resistance is a serious threat for vector control, it would be dangerous to extrapolate from those results and to become too alarmist before having delimited the geographical extension of this resistance and its impact on the protective effect of impregnated bednets. The risk for resistance to increase is very difficult to estimate because it is almost impossible to evaluate the overall selective pressure by pyrethroids and the specific impact of malaria programmes in the build-up of pyrethroid resistance.

Not enough attention has been paid so far to the pyrethroid resistance in African malaria vectors. Therefore, it is urgent to set up in Africa a network to monitor their susceptibility/resistance level. Its main objectives will be to gather more information on the current situation of resistance and to follow its evolution, especially in areas where vector control operations are planned. It is also important to strengthen basic research on resistance mechanisms and operational research on the impact of resistance on the efficacy of bednets in the field.

As a consequence of cross resistance due to kdr gene (14. our unpublished data), there is an urgent need for alternatives to current available pyrethroids. In this regard, the WHOPES (WHO Pesticide Evaluation Scheme) has a major role to play. Collaborating centres have to be rehabilitated with a priority to those working on malaria vectors in areas where An. gambiae s.l. has already developed resistance to pyrethroids. Collaboration with agrochemical companies should also be stimulated in order to ensure that any useful existing insecticide will not be withdrawn from the market and that the search for new insecticides will be actively encouraged.

Acknowledgements

This work was partly funded by the French Ministry of Health in the framework of a study on the control of airport malaria. We are grateful to Agrevo company who kindly provided insecticide active ingredients.

Résumé

La sensibilité d'An. gambiae s.l. à deux pyréthrinoides (perméthrine, deltaméthrine) et au DDT a été évaluée dans 4 pays d'Afrique de l'Ouest (Bénin, Côte d'Ivoire, Burkina Faso et Sénégal), au Cameroun (Afrique centrale) et au Botswana (Afrique australe). Les tests ont été réalisés sur des femelles sauvages selon le protocole OMS et en observant l'évolution du nombre de moustiques knockdown (kd) au cours de l'exposition à l'insecticide. La résistance à la perméthrine a été confirmée à Bouaké ainsi que dans 7 des 8 autres localités testées en Côte d'Ivoire. Cette résistance a également été observée au Bénin et au Burkina Faso. Pour les populations les plus résistantes à la perméthrine, on observe une forte baisse de la mortalité avec la deltaméthrine. Les populations du Sénégal, du Cameroun et du Botswana se sont révélées sensibles. La résistance aux pyréthrinoides s'accompagne également d'une diminution de l'effet kd, plus marquée avec la perméthrine qu'avec la deltaméthrine. La baisse de l'effet kd peut même être significative avant que l'on observe une baisse de la mortalité. Elle peut donc être considérée à ce titre comme un indicateur précoce de la résistance. Le gène kdr est hérité de la résistance au DDT qui était apparue dans les années 60 suite à l'utilisation massive de ce produit contre les ravageurs du coton. Il s'est maintenu dans les populations anophéliennes sous la pression de sélection exercée par les pyréthrinoides agricoles et peut-être domestiques. Il est urgent, à l'heure où de nombreux pays envisagent de lancer des programmes de lutte contre le paludisme par moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides, de mettre en place un réseau de surveillance de la résistance afin d'évaluer son extension actuelle et de préciser son impact sur la protection conférée par les moustiquaires imprégnées.

Abstract

Pyrethroid resistance in *An. gambiae* s.l. has been confirmed in Côte d'Ivoire and observed in two other countries of West Africa (Benin and Burkina Faso). Malaria vector populations from Senegal, Cameroon (Central Africa) and Botswana (Southern Africa) were found susceptible. Resistance to permethrin induced a decrease of mortality not only for this compound but also for deltamethrin in the most resistant populations. Moreover, a significant increase of knockdown time was observed in some populations before any decrease of mortality, suggesting that knockdown time could be a good indicator for an early detection of resistance. Considering the current extension of pyrethroid resistance, it is urgent to set up in Africa a network to evaluate its evolution. It is also urgent to assess its impact on pyrethroid impregnated bednets.

References

1. **Brown AWA, Pal R.** Résistance des arthropodes aux insecticides. World Health Organisation, Genève, 1973 (Série de Monographies, N° 38).
2. **Mouchet J.** Mini-review: agriculture and vector resistance. Insect Science and its Applications, 1988, **9**: 297-302.
3. **Lines JD.** Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes ? A look at the evidence. Parasitology Today, 1988, **4**: 17-20.
4. **Martinez-Torres D et al.** A molecular diagnostic of pyrethroid resistance in the malaria vector Anopheles gambiae s.s. Insect Molecular Biology, 1997 (submitted).
5. **Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman AJ.** DDT-resistance in Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione-S-transferases. Bulletin of Entomological Research, 1995, **85**: 267-274.
6. **Elissa N et al.** Resistance of Anopheles gambiae s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. Annales de la Société belge de Médecine Tropicale, 1993, **73**: 291-294.
7. **Vulule JM et al.** Reduced susceptibility of Anopheles gambiae to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. Medical and Veterinary Entomology, 1994, **48**: 71-75.
8. **Hemingway J et al.** Insecticide susceptibility status in individual species of Anopheles gambiae complex (Diptera: Culicidae) in an area of The Gambia where pyrethroid impregnated bednets are used extensively for malaria control. Bulletin of Entomological Research, 1995, **85**: 229-234.

9. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Dix-septième rapport du Comité OMS d'experts des Insecticides. Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 1970 (OMS, Série de Rapports techniques, N° 443).
10. **Raymond M, Prato G, Ratsira D.** PROBIT analysis of mortality assays displaying quantal response, version 3.3. Licence L93019. Praxème, 34680 St. Georges d'Orques, France, 1993.
11. **Finney DJ.** Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
12. **Kang W et al.** Tests for possible effects of selection by domestic pyrethroids for resistance in culicine and anopheline mosquitoes in Sichuan and Hubei, China. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 1995, **89**: 677-684.
13. **Privora M.** Use of KT 50 for orientative evaluation (screening) of sensitivity of flies to insecticides. Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology Immunology, 1975, **19**: 184-194.
14. **Hemingway J.** Efficacy of etofenprox against insecticide susceptible and resistant mosquito strains containing characterized resistance mechanisms. Medical and Veterinary Entomology, 1995, **9**: 423-426.

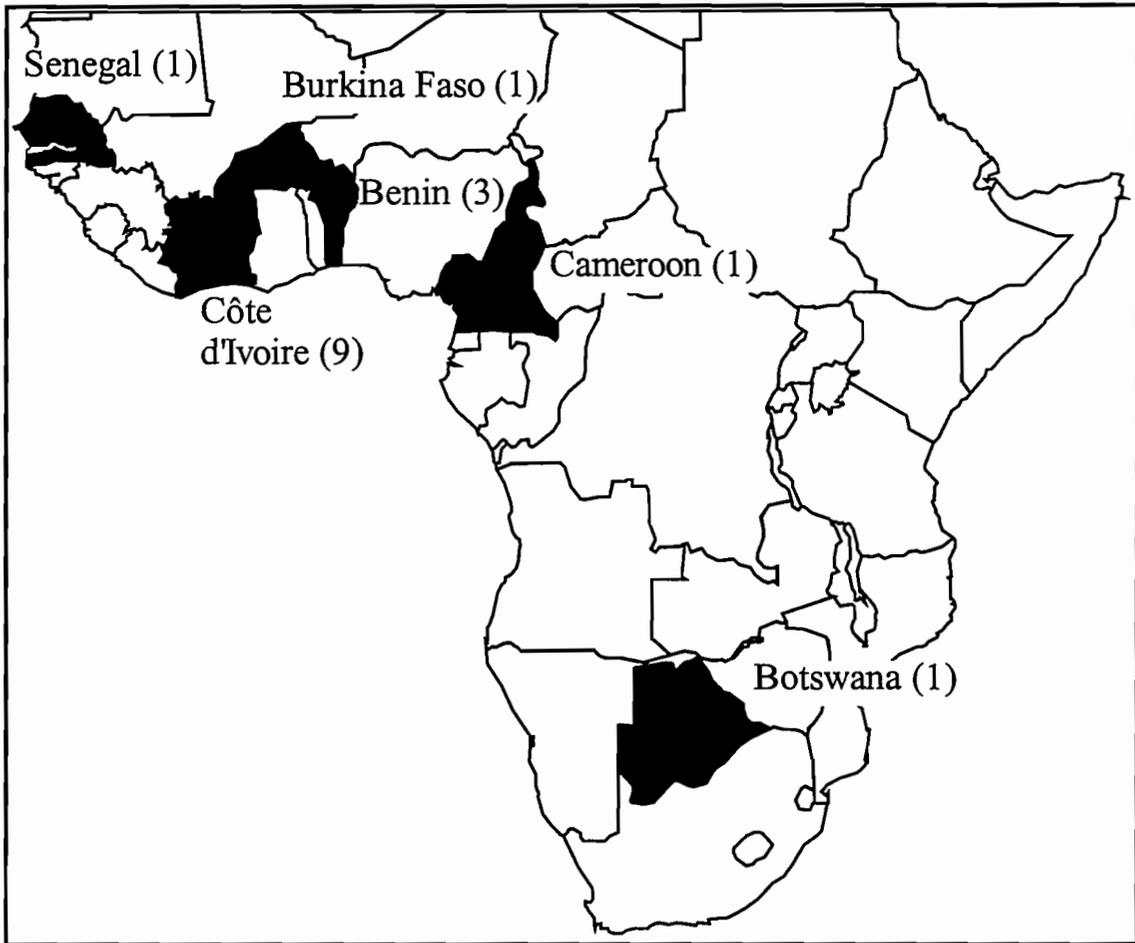


Figure: Map locations of countries surveyed, number of samples are indicated in parenthesis

Table 1: Mortality in field samples of *An. gambiae* s.l. 24 hours after 1 hour exposure to insecticide impregnated papers in WHO test tubes.

Country	Locality	Permethrin* 0.25%	Deltamethrin* 0.025 %	DDT* 4%	Resistance Status
Susceptible Ref. Strain	Kisumu	86.8 % (320)	100 % (100)	100 % (300)	S
Botswana	Sebina	86.3 % (121)	-	99.6 % (188)	S
Cameroon	Yaounde	85.2 % (135)	100 % (40)	90.0 % (80)	S
Senegal	Dakar	76.2 % (52)	-	-	S
Burkina Faso	Kou Valley	29.2 % (113)	95.2 % (186)	67.3 % (243)	R
Côte d'Ivoire	Abidjan	75.4 % (57)	-	75.8 %	S**
	Bouake	48.0 % (102)	98.4 % (60)	-	R
	Odienne	61.9 % (110)	-	-	R
	Kafine	54.5 % (99)	-	-	R
	Daloa	50.0 % (104)	-	-	R
	Katiola	69.2 % (104)	-	-	R
	Tai	26.7 % (60)	36.2 % (58)	-	R
	Korhogo	7.3 % (55)	30.6 % (62)	7.1 % (84)	R
	Yao Koffikro	10.0 % (120)	28.4 % (117)	17.6 % (102)	R
Benin	Cotonou 1	38.9 % (54)	-	-	R
	Cotonou 2	20.2 % (376)	18.7 % (124)	11.5 % (128)	R

* WHO diagnostic concentration

S: susceptible; R: resistant; S**: pyrethroid susceptible with reduced susceptibility to DDT 4%.

Number of mosquitoes are indicated in parenthesis

Table 2: Correspondence between mortality and knockdown time (in minutes) using WHO test tubes.

Insecticide	Sample	Mortality	KDT50 (min)	KDT95 (min)	Resistance status
Permethrin 0.25 %	Kisumu Ref S*	86.8%	23.5	44.5	S
	Sebina	86.3 %	40.2	86.7	S
	Yaounde	85.2 %	46.1	158.3	S
	Dakar	76.9 %	40.3	140.7	S
	Kou Valley	61.6 %	80.7	228.2	R
	Abidjan	75.4 %	99.3	786.3	S**
	Tai	26.7 %	110.2	378.0	R
	Yao Koffikro	10.0 %	No kd	No kd	R
	Korhogo	7.3 %	No kd	No kd	R
	Cotonou 1	38.9 %	No kd	No kd	R
	Cotonou 3	34.1 %	No kd	No kd	R
Deltamethrin 0.025 %	Kisumu Ref S*	100 %	21.4	39.5	S
	Yaounde	100 %	21.3	56.4	S
	Kou Valley	95.2 %	31.6	66.3	R
	Tai	36.2 %	84.0	252.5	R
	Yao Koffikro	28.4 %	78.7	339.7	R
	Korhogo	30.6 %	76.6	260.0	R
DDT 4 %	Kisumu Ref S*	100 %	23.6	38.3	S
	Sebina	99.6 %	23.3	46.8	S
	Yaounde	90.0 %	60.7	127.4	S
	Yaokoffikro	17.6 %	118.3	581.7	R
	Korhogo	7.1 %	No kd	No kd	R

* Reference susceptible strain

No kd: complete loss of kd effect (less than 15% of kd mosquitoes after one hour exposure)

S: susceptible; R: resistant; S**: pyrethroid susceptible with reduced susceptibility to DDT 4%.

Article 6

Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Bergé J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N., Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. 7: 179-184.

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

D. Martinez-Torres,^{1*} F. Chandre,² M. S. Williamson,³ F. Darriet,² J. B. Bergé,¹ A. L. Devonshire,³ P. Gullet,² N. Pasteur⁴ and D. Pauron¹

¹Laboratoire de Biologie des Invertébrés, I.N.R.A., Antibes, France, ²Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, O.R.S.T.O.M., Montpellier, France, ³Department of Biological and Ecological Chemistry, IACR-Rothamsted, Harpenden, Herts., UK, and ⁴Institut des Sciences de l'Evolution (UMR CNRS 5554-97), Université Montpellier II, Montpellier, France

Abstract

Pyrethroid-impregnated bednets are playing an increasing role for combating malaria, especially in stable malaria areas. More than 90% of the current annual malaria incidence (c. 500 million clinical cases with up to 2 million deaths) is in Africa where the major vector is *Anopheles gambiae s.s.* As pyrethroid resistance has been reported in this mosquito, reliable and simple techniques are urgently needed to characterize and monitor this resistance in the field. In insects, an important mechanism of pyrethroid resistance is due to a modification of the voltage-gated sodium channel protein recently shown to be associated with mutations of the *para*-type sodium channel gene. We demonstrate here that one of these mutations is present in certain strains of pyrethroid resistant *A. gambiae s.s.* and describe a PCR-based diagnostic test allowing its detection in the genome of single mosquitoes. Using this test, we found this mutation in six out of seven field samples from West Africa, its frequency being closely correlated with survival to pyrethroid exposure. This diagnostic test should bring major improvement for field monitoring of pyrethroid resistance, within the framework of malaria control programmes.

* Present address: Departamento de Genética, Facultad de Biología, c/o Dr Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

Received 19 June 1997; accepted 6 October 1997. Correspondence: Dr David Pauron, Laboratoire de Biologie des Invertébrés, I.N.R.A., 123 bd Meilhan, 06606 Antibes cedex, France e-mail: pauron@antibes.inra.fr.

Keywords: pyrethroid, resistance, mosquito, diagnostic.

Introduction

In the 1950s the worldwide Malaria Eradication Programme was almost entirely based on vector control using DDT and dieldrin insecticides. Since 1965, control of the major vector, *Anopheles gambiae s.s.*, has more or less been abandoned in Africa, partly because of insecticide resistance. This preventative measure was reintroduced only recently using pyrethroid-impregnated bednets (Choi *et al.*, 1995). As no insecticide class with similar efficiency is currently available, there is an urgent need for a reliable tool to detect and monitor pyrethroid resistance in malaria vector populations (Elissa *et al.*, 1993). Pyrethroids act on the nervous system by modifying the gating kinetics of voltage-sensitive sodium channels (Lund & Narahashi, 1983). One important type of resistance to pyrethroids is characterized by a marked reduction in the intrinsic sensitivity of the insect nervous system to these compounds. It confers resistance not only to pyrethroids but also to DDT which shares a similar mode of action. This mechanism was first identified in DDT-resistant houseflies, *Musca domestica*, and was termed knock-down resistance or *kdr* (Milani, 1954). It has recently been reported that a single mutation (leucine to phenylalanine) in the S6 transmembrane segment of domain II in the sodium channel sequence is associated with *kdr* to pyrethroids and DDT in *M. domestica* (Williamson *et al.*, 1996a) and the German cockroach, *Blattella germanica* (Miyazaki *et al.*, 1996). Moreover, a different mutation (leucine to histidine) at this same position has been found in pyrethroid-resistant populations of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Park & Taylor, 1997). In *super-kdr* houseflies, this mutation is associated with a second substitution further upstream in the same domain which replaces a methionine with a threonine (Williamson *et al.*, 1996a). Since *kdr* is due to an alteration of the

insecticide affinity for its binding site on the sodium channel (Pauron *et al.*, 1989), it is possible that a limited number of modifications in the target site can promote nerve insensitivity against these compounds and therefore resistance.

In this study we have analysed the domain II region of the *para*-type sodium channel from pyrethroid susceptible and resistant strains of *A. gambiae* and identified in the resistant strains the same Leu to Phe point mutation as described for houseflies and cockroaches. This result has enabled us to develop a simple PCR-based diagnostic test for the rapid identification of this *kdr*-like allele, even when heterozygous, in natural mosquito populations.

Results and Discussion

Partial cDNA sequencing of the para-type sodium channel in Anopheles gambiae s.s.

Partial sodium channel sequencing was carried out on four *Anopheles gambiae* strains: Kisumu and Bobo are laboratory susceptible strains and Tola (from Côte d'Ivoire) and Kou Valley (from Burkina Faso) were obtained in 1993 and 1995 respectively from field resistant samples which were further selected with permethrin in the laboratory until all insects survived the current W.H.O. diagnostic permethrin concentration (0.25%). *Kdr* was implicated as the most likely mechanism because of the cross resistance to DDT and complete loss of the rapid knockdown effect by these compounds.

Total RNA extracted from the four strains was used to synthesize the first-strand cDNA. Primary PCR on the single-stranded cDNA was carried out with D1 and Dg2 primers (Table 1). As the fragment of interest was not always resolved as a unique single band because of primer degeneracy, we performed a secondary PCR using the nested primer Dipd1 with Dg2. A single specific fragment of 407 bp was then amplified and directly sequenced (Fig. 1). Comparison of the *Ano-*

pheles sequence with the housefly and *Drosophila para*-type sodium channel sequences showed clearly that we had amplified a *para* homologous sodium channel fragment rather than that of *DSC1*, a second sodium channel gene described in *Drosophila* (Salkoff *et al.*, 1987). At the amino acid level, 95% and 97% identity were found between the *Anopheles* sequence and the *Drosophila* and housefly *para* sequences.

A comparison of the aligned nucleotide sequences obtained for the four *Anopheles* strains revealed only one nucleotide change (Fig. 1). This change is responsible for the substitution of a leucine residue (TTA) present in both susceptible strains (Bobo and Kisumu) by a phenylalanine (TTT) in both resistant strains (Kou Valley and Tola). This change coincides exactly with the reported Leu to Phe mutation in *kdr* houseflies (Williamson *et al.*, 1996a) and cockroaches (Miyazaki *et al.*, 1996). The observation of the same amino acid substitution in mosquitoes provides further evidence that this mutation is involved in resistance since the leucine residue at this position in susceptible insects is highly conserved during evolution in both vertebrates and invertebrates (Williamson *et al.*, 1996a). This striking convergence suggests that the mutated leucine probably plays a crucial role in the pyrethroid-sodium channel interaction and that its substitution by a different amino acid leading to *kdr* must be highly specific in order to keep the channel functional. Moreover, in *M. domestica*, *D. melanogaster* and several other insect species from different orders (Martinez-Torres *et al.*, 1997), this leucine is encoded by the codon CTT, and therefore to substitute a phenylalanine in *kdr* insects the first position of the triplet has changed to a T. Interestingly, in *A. gambiae* and the German cockroach the same conserved leucine is encoded by TTA and TTG respectively and the change into phenylalanine involves replacing the third position of the triplet. Therefore phenylalanine is probably one of a limited number of possible substitutions. The histidine found in *kdr Heliothis* replacing the same leucine (Park & Taylor, 1997) would be a second alternative, which appears at present to be less widespread. In this context, it is worth mentioning the reported convergence to the same amino acid substitution (Ala to Ser) in a GABA-gated chloride channel, *Rdl*, responsible for resistance to cyclodiene insecticides among a wide range of insect species (French-Constant, 1994). The same *kdr*-associated mutation of Leu to Phe has so far been reported in pyrethroid resistant strains of five insect species from four different orders, Diptera (*M. domestica* and *A. gambiae*), Dictyoptera (*Blattella germanica*) and, very recently (Martinez-Torres *et al.*, 1997), Lepidoptera (*Plutella xylostella*) and Hemiptera (*Myzus persicae*). Further characterization of sodium

Table 1. Sequences of the primers used throughout this study.

D1	5' AARYTNGCNAARTCTTGGCC 3'
D4	5' ACRAARTCNARCCARCACCA 3'
Dg1	5' TGGATHGARWSHATGTGGGAYTG 3'
Dg2	5' GCDATYTRTTNGTNGTNTCRITTRTC 3'
Dipd11	5' TGGCCSACRCKAAYTTACTC 3'
Dip2	5' TTGGACAAAAGCAARGCTAAG 3'
Dip3	5' ATCATCTTCATCTTTGC 3'
Mos1	5' ACYGTAGTGATAGGAAAT 3'
Agd1	5' ATAGATCCCCGACCATG 3'
Agd2	5' AGACAAGGATGATGAACC 3'
Agd3	5' AATTTCATTACTTACGACA 3'
Agd4	5' CTGTAGTGATAGGAAATTTA 3'

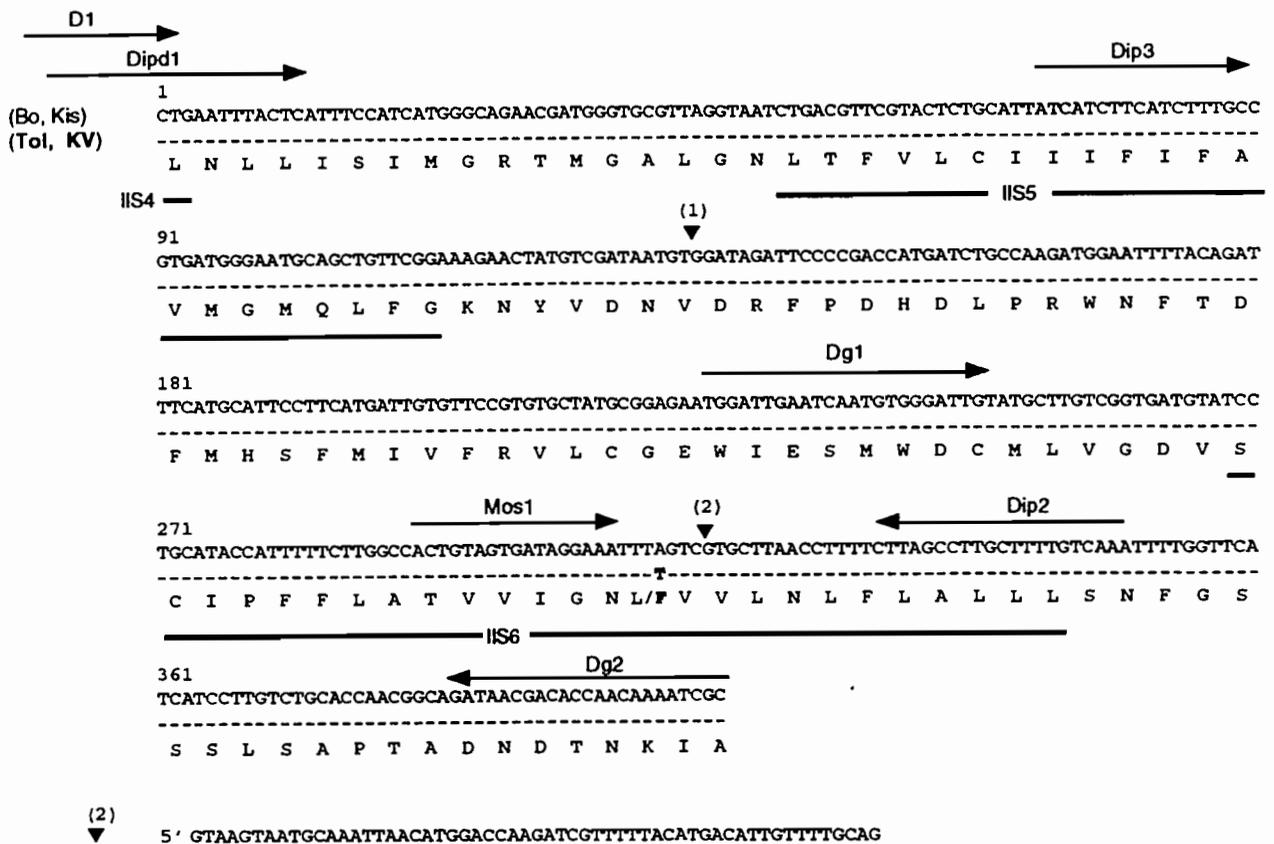


Figure 1. Sequence analysis of the IIS4–IIS6 region of the voltage-sensitive sodium channel in susceptible Bobo (Bo) and Kisumu (Kis) strains and in *kdr* Kou Valley (KV) and Tola (Tol) strains of *A. gambiae*. Identical positions are indicated by a dash (–). In the predicted amino acid sequence below, the single change (leucine/phenylalanine) is highlighted. The positions of the two introns present in this region are indicated by a ▼. The sequence of the second intron which was necessary for designing the ‘*kdr* specific’ primer used in the diagnostic test is presented below. This sequence is identical in the four strains. The sequence has been deposited in the GenBank database (accession number Y13592).

channel genes in pyrethroid-resistant strains from other insect species will elucidate the extent of the convergence discussed here.

Designing a diagnostic test for kdr alleles in A. gambiae

Two introns are known to exist in the domain II region of the sodium channel gene at conserved positions in *Drosophila* and *M. domestica* (our unpublished results, see Fig. 1). One of these introns (i.e. intron 2 in Fig. 1) is located only 4 bp apart downstream of the *kdr* mutation and therefore knowledge of both its sequence and its level of conservation among the different strains was necessary in order to design specific oligonucleotides to be used on genomic DNA. We PCR-amplified through this region on genomic DNA from single mosquitoes using primers Dg1 and Dg2 (see experimental procedures). Using primers Mos1 and Dip2 directly on the amplified fragment, we read through the intron 2 sequence in the four *Anopheles* strains. We found that the position of this intron was conserved with respect to the houseflies and *Droso-*

phila sequences but no sequence homology was detected. Its size is also different: 55 bp in *Anopheles* and about 130 bp in the other Diptera (unpublished results). The sequence of intron 2 is entirely conserved in the four *A. gambiae* strains analyzed (Fig. 1).

These results enabled us to adopt a simple, single PCR test for identifying the resistance genotype using four primers (Williamson *et al.*, 1996b) as illustrated in Fig. 2A. Two ‘common’ primers asymmetrically flank the region of the mutation; another primer is specific for the susceptible genotype by having an A at the 3’ OH end of the sequence present in susceptible mosquitoes, and the last one is a *kdr* antisense specific primer ending at its 3’OH end with an A (complementary to the T specific for *kdr* strains) and which partially overlaps the intron sequence. Using genomic DNA extracted from single mosquitoes, unambiguous genotyping of susceptible and resistant individuals was possible as the method provides an internal control band (293 bp) and a band of different size in susceptible and *kdr* mosquitoes (137 and 195 bp, respectively). In the off-

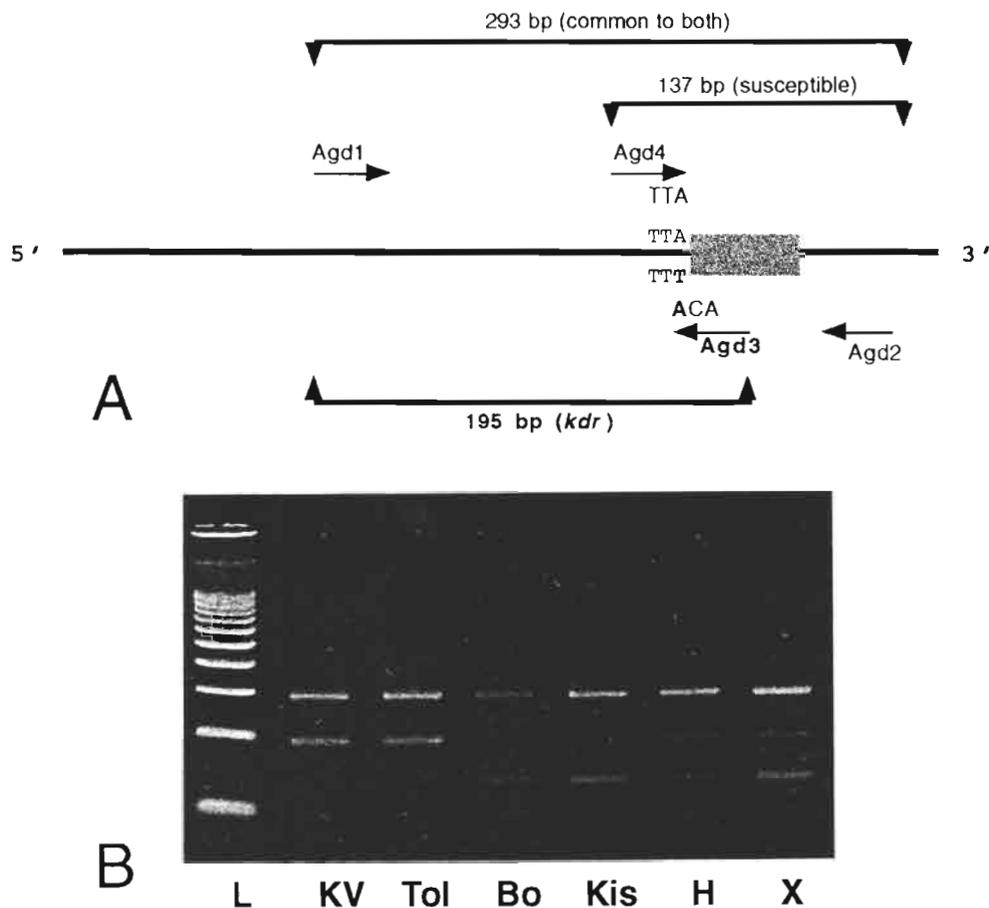


Figure 2. Identification of *kdr* by PCR-based diagnostic test. (A) Schematic representation of the experiment. The positions of the triplets encoding leucine (TTA) in susceptible mosquitoes and phenylalanine (TTT) in *kdr* individuals are indicated above and below the thick line representing the IIS4-IIS6 region of the sodium channel. The position of intron 2 is represented by a shaded box. (B) PCR products obtained using the test on four *Anopheles* strains after separation on a 1.5% agarose gel. Lane L: 100 bp ladder; lanes 2–7: products obtained using genomic DNA of single mosquitoes as templates; lanes KV and TOL: *kdr* insects (Kou Valley, Tola); lanes BO and KIS: susceptible insects (Bobo, Kisumu); lane H: equimolar mixture of genomic DNA from Kou Valley and Bobo insects; lane X: pattern obtained using the genomic DNA of the offspring of a Kou Valley \times Bobo cross as a template.

spring of a susceptible \times resistant cross, as well as in a mixture of equimolar amounts of genomic DNA from susceptible and resistant insects, three bands were systematically obtained, indicating that heterozygotes can also be distinguished (Fig. 2B).

Application of the diagnostic test to field populations

The validity of the PCR diagnostic test was checked by studying the sodium channel polymorphism in seven field samples collected in Côte d'Ivoire and Burkina Faso. The three genotypes (Leu/Leu, Leu/Phe, Phe/Phe) were clearly identified. The frequency of the resistant allele was strongly correlated ($P = 0.0005$) with the reduced mortality observed in bioassays with the W.H.O. discriminating concentration of permethrin (W.H.O., 1970) as shown in Fig. 3. This indicates that *kdr* is the major mechanism of pyrethroid resistance in these field populations. The efficacy of pyrethroids on

resistant mosquitoes was shown to be dramatically reduced among mosquitoes of the two most resistant populations, Yao Koffikro and Korhogo: exposure for 3 min to nets treated with 25 mg/m² deltamethrin formulation using W.H.O. cones resulted in only 10% and 1.3% mortality, respectively versus 100% with a susceptible strain (unpublished data). It is not clear at this stage how the presence of *kdr* in the field will affect operational control. However, in view of the usual cross resistance conferred by this mechanism to other pyrethroids, immediate and long-term efficacy of impregnated bednets in the concerned areas should be closely investigated.

In stable malaria areas of Africa the strategy for prevention currently recommended by W.H.O. relies almost entirely on the use of pyrethroid-impregnated bednets at community level (W.H.O., 1993). As more and more bednet programmes are launched, it is

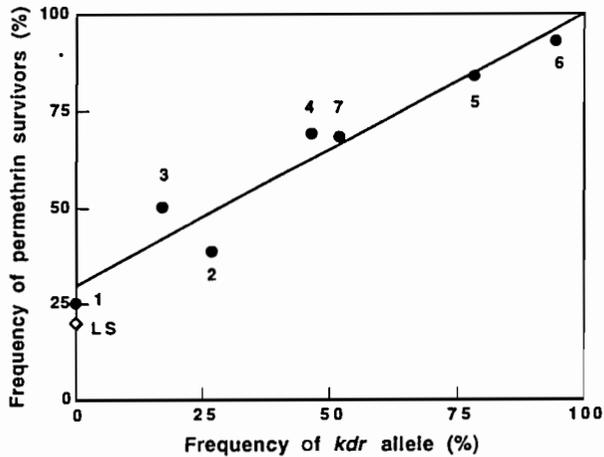


Figure 3. Relationship between the frequencies of surviving adults and of the *kdr* allele, as determined by the PCR test in seven field samples of *A. gambiae* s.s. from West Africa ($y = 0.70x + 29.3$; $r_{yx} = 0.96$; $P = 0.0005$ for $H_0: r_{yx} = 0$). The frequency of the *kdr* allele was determined for thirty individuals and the frequency of permethrin survivors was measured from 100 insects. Numbers refer to localities as follows: Côte d'Ivoire: 1, Abidjan; 2, Odiénne; 3, Daloa; 4, Kafine; 5, Yaokoffikro; 6, Korhogo; Burkina Faso: 7, Kou Valley (before selection); LS: laboratory susceptible strain (Kisumu).

urgent to evaluate the prevalence of *kdr* alleles and to monitor pyrethroid resistance in the target mosquito populations. One important aspect of a molecular diagnostic such as the PCR test described here over conventional bioassays for monitoring is that, *kdr* being recessive, it can also discriminate between heterozygotes and susceptible homozygotes. Hence the molecular diagnostic is far more powerful at picking up very low frequencies of resistance genes which are then mainly present in heterozygous form, and resistance management could be implemented at a very early stage. Other important vectors of malaria and other diseases in the world have also developed pyrethroid resistance and *kdr* has been implicated in some cases (Omer *et al.*, 1980). Because the sodium channel region involved in *kdr* resistance is apparently highly conserved, the diagnostic test proposed here might be usable with few or no modifications for monitoring pyrethroid *kdr* as part of the planning and implementation of malaria vector control operations in Africa and elsewhere.

Experimental procedures

Mosquito populations and bioassays

Samples of *Anopheles gambiae* s.s. were collected in six localities from Côte d'Ivoire separated by at least several hundred kilometres (Abidjan, urban area; Odiénne, peri-urban; Daloa, urban; Kafine, rural; Yaokoffikro, rural; Korhogo, rural) and one from Burkina Faso (Kou Valley, rural). Mature larvae were transported to the laboratory and

reared to adults under standard conditions. Tests were carried out with 2–4-day-old non-bloodfed females emerged from wild larvae or on generation of laboratory rearing using W.H.O. insecticide susceptibility tests. Five replicates of twenty females were exposed during 1 h to papers impregnated with permethrin (cis/trans ratio: 25/75) at a concentration of 0.25%. Mortality was checked 24 h post exposure. Mosquitoes exposed to untreated papers served as controls. Resistance status of wild populations was compared to a susceptible reference strain of *A. gambiae* s.s., Kisumu (Kenya).

Two resistant field populations were submitted to permethrin selection in the laboratory for fifteen and twenty-five generations, respectively, for Kou Valley (Burkina Faso) and Tola (Côte d'Ivoire) by exposing adults of each generation for 1 h to permethrin-impregnated papers at concentrations providing 80–90% mortality.

Partial sequencing of the sodium channel gene

The IIS4–IIS6 coding region of the sodium channel gene was amplified by RT-PCR using 1–5 µg of total RNA as template for cDNA synthesis. RNA was extracted from single mosquitoes by the guanidinium-hydrochloride/phenol-chloroform method (Logemann *et al.*, 1987). First-strand cDNA synthesis was performed according to the supplier's protocol (SuperscriptII, Gibco-BRL) using as primers a mixture of 200 ng of oligo-dT (Gibco BRL), plus 200 ng of an antisense sodium channel primer (D4) corresponding to a conserved sodium channel sequence downstream the region of interest (Table 1). Two rounds of PCR were carried out to selectively amplify this region. The primary PCR reaction was carried out on the cDNA using the degenerate sodium primers D1 and Dg2 that flank the region of interest. One unit of Taq polymerase (Eurogentec) in buffer supplied by the manufacturer (75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% (w/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl_2), 250 ng of each primer and 0.2 mM dNTP were used in a 50 µl total volume PCR reaction consisting of 35 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 2 min, 72°C for 2 min and a final extension step at 72°C for 10 min. A secondary PCR was then carried out on the primary product using at the 5' end a nested Diptera specific primer (Dipd1) based on the *Drosophila melanogaster* (Loughney *et al.*, 1989) *Musca domestica* (Williamson *et al.*, 1996a), and *Culex pipiens* (our unpublished data) *para*-type sodium channel sequences and keeping at the 3' end the same primer used in the primary PCR (Dg2). PCR conditions were the same as for the primary PCR except that the annealing temperature was reduced to 48°C and the total reaction volume increased to 100 µl. The 407 bp amplified fragment was then recovered by ethanol precipitation and used as template for direct sequencing with the automated ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI). Sequencing primers (Dip3, Dip2 and Mos1) were based on conserved sequences present in *Drosophila*, housefly and *C. pipiens*. The positions of all the primers used both for PCR and sequencing are indicated in Fig. 1, and their sequences are listed in Table 1.

Intron sequence determination

Genomic DNA was extracted from single mosquitoes according to Martínez-Torres *et al.* (1992) with some modifications. Single individuals were homogenized in 100 µl 10 mM Tris-HCl, 60 mM NaCl, 5% sucrose, 10 mM EDTA, pH 7.8. Then, 125 µl of 1.25% SDS, 300 mM Tris-HCl, 5% sucrose, 10 mM EDTA, pH 7.8

were added. The mixture was incubated at 65°C for 30 min and 40 µl of 5 M potassium acetate pH 4.8 were added afterwards. After incubation at -20°C for 10 min the mixture was centrifuged at 13,000 g and the supernatant was collected. Two volumes of cold absolute ethanol were added and the mixture kept at -20°C for 15 min prior to centrifugation at maximum speed to precipitate nucleic acids. The genomic region containing the intron of interest (intron 2 in Fig. 1) was PCR amplified on 10–50 ng of genomic DNA using primers Dg1 and Dg2 (see Table 1 and Fig. 1). One unit of Taq polymerase (Eurogentec) and 200 ng of each primer were used in a 100 µl total PCR volume. Amplification was performed for 35 cycles at 94°C for 1 min, 54°C for 2 min and 72°C for 2 min with a final extension step at 72°C for 10 min. After ammonium precipitation, automated sequencing was performed through the intron sequence using primers Mos1 and Dip2.

DNA diagnostic test for *kdr* alleles in single mosquitoes

10–50 ng of genomic DNA prepared as above were combined in a 50 µl total volume with the four primers Agd1, Agd2, Agd3 and Agd4. The PCR reaction conditions were 1 min at 94°C, 2 min at 48°C and 2 min at 72°C for forty cycles with a final extension step at 72°C for 10 min. Amplified fragments were analysed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and were visualized by ethidium bromide staining under UV light.

Acknowledgements

We are grateful to S. Manguin for skilful assistance. J.-B.B., A.L.D., D.P., N.P. and M.S.W. are members of ENIGMA, the European Network for Insect Genetics in Medicine and Agriculture. This work was supported by the E.U., the Programme Environnement, Vie et Société (CNRS-GDR 1105), the Ministère de l'Éducation Nationale (ACCSV3-9503037), and the UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council.

References

- Choi, H.W., Breman, J.G., Teutsch, S.M., Liu, S., Hightower, A.W. and Sexton, J.D. (1995) The effectiveness of insecticide-impregnated bed nets in reducing cases of malaria infection: a meta-analysis of published results. *Am J Trop Med Hyg* **52**: 377–382.
- Elissa, N., Mouchet, J., Rivière, F., Meunier, J.Y. and Yao, K. (1993) Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc Belge Med Trop* **73**: 291–294.
- French-Constant, R. (1994) The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem Molec Biol* **24**: 335–345.
- Loughney, K., Kreber, R. and Ganetzky, B. (1989) Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* **58**: 1143–1154.
- Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analyt Biochem* **163**: 16–20.
- Lund, A.E. and Narahashi, T. (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.
- Martinez-Torres, D., Moya, A., Latorre, A. and Fereres, A. (1992) Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. *Ann Entomol Soc Amer* **85**: 241–246.
- Martinez-Torres, D., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S. (1997) Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pestic Sci* **51**: 265–270.
- Milani, R. (1954) Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. *Riv Parasitol* **15**: 513–542.
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y. and Matsumura, F. (1996) Cloning and sequencing of the *para*-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* **252**: 61–68.
- Omer, S.M., Georghiou, G.P. and Irving, S.N. (1980) DDT/pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. *Mosquito News* **40**: 200–209.
- Park, Y. and Taylor, M.J.F. (1997) A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem Molec Biol*, **27**: 9–13.
- Pauron, D., Barhanin, J., Amichot, M., Pralavorio, M., Bergé, J.B. and Lazdunski, M. (1989) Pyrethroid receptor in the insect Na⁺ channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. *Biochemistry* **28**: 1673–1677.
- Salkoff, L., Butler, A., Wei, A., Scavarda, N., Giffen, K., Ifune, C., Goodman, R. and Mandel, G. (1987) Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science* **237**: 744–749.
- W.H.O. (1993) Mise en oeuvre de la stratégie mondiale de lutte antipaludique. *Tech Rep Ser* **839**, 67 pp. Geneva.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. and Devonshire, A.L. (1996a) Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* **252**: 51–60.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Castells, N. and Devonshire, A.L. (1996b) Analysis of sodium channel gene sequences in pyrethroid-resistant houseflies. *ACS Symposium Series* **645**: 52–61.

Article 7

Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., Carnevale P., Guillet P. 1998. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15: sous presse.

I have checked this proof.
I have marked all changes or
corrections I wish to be made.

DEC 22 1998

Journal of the American Mosquito Control Association, 15(1):000-000, 1999
Copyright © 1999 by the American Mosquito Control Association, Inc.

Signed _____

TELEPHONE
PYRETHROID CROSS RESISTANCE SPECTRUM AMONG
POPULATIONS OF *ANOPHELES GAMBIAE* S.S. FROM CÔTE D'IVOIRE

FABRICE CHANDRE,¹ FREDERIC DARRIET,² SYLVIE MANGUIN,¹ CECILE BRENGUES,¹ PIERRE CARNEVALE² AND PIERRE GUILLET¹

transfer down

ABSTRACT. Field samples of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire were tested with 5 pyrethroids (cyfluthrin, λ-cyhalothrin, α-cypermethrin, deltamethrin, permethrin), 1 pseudo-pyrethroid (etofenprox), and an organochlorine (DDT). With the use of World Health Organization diagnostic tests, 5 out of 6 samples were found cross-resistant to these insecticides. A strong decrease in knockdown effect and mortality was also observed when testing deltamethrin-impregnated nettings. With a polymerase chain reaction amplification of specific alleles diagnostic test, resistance was found associated with the presence of a *kdr* mutation. The strong correlation between *kdr* allelic frequency and resistance to DDT or etofenprox indicated that *kdr* was the main resistance factor for these 2 insecticides. On the contrary, a lower correlation was observed between *kdr* frequency and resistance to 4 of the 5 pyrethroids tested, suggesting that another mechanism was also involved, likely a metabolic detoxification. These results point out the necessity to monitor pyrethroid resistance and the presence of *kdr* before implementation of any impregnated bed-net programs for malaria control.

KEY WORDS *Anopheles gambiae*, pyrethroid, resistance, *kdr*, malaria control, Côte d'Ivoire, West Africa

INTRODUCTION

Vector control is an important component of the World Health Organization (WHO) global strategy for malaria prevention. The main objective is to break the transmission of the parasite with indoor residual spraying or pyrethroid impregnated materials (bed-nets or curtains). Pyrethroids are preferably used for impregnation because they are highly effective and fast acting insecticides with a strong excito-repellent effect on mosquitoes.

Anopheles gambiae s.l. Giles is the main malaria vector in Africa, where 90% of the world cases occur. Resistance of *An. gambiae* s.s. to pyrethroids was first observed in Côte d'Ivoire (West Africa) by Elissa et al. (1993), who reported a significantly decreased mortality for permethrin and a lower susceptibility to the knockdown effect of deltamethrin and λ-cyhalothrin. More recently, knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroids and DDT was observed in several countries from West Africa (Chandre et al. 1997). Investigations on the target site for pyrethroids and DDT have shown that this resistance was associated with a single point mutation on the gene coding for the sodium channel, resulting in the change of one amino acid (Martinez-Torres et al. 1997). A polymerase chain reaction (PCR) amplification of specific alleles (PASA) diagnostic test has been developed to identify the mutation on a single mosquito and to score for the genotype.

The current pyrethroid resistance observed in West Africa has been suspected to result mainly from the intensive use of DDT and, later on, pyrethroids for crop protection, especially cotton.

Côte d'Ivoire, where resistance was 1st pointed out, is a country with intensive agriculture where huge amounts of insecticides have been used for many years. Therefore, we decided to carry out a survey in several localities from this country to verify whether resistance was widespread. Because the *kdr* mutation is known to induce a broad spectrum of cross-resistance to DDT and pyrethroids (Farnham 1973, 1977), we also tested other available pyrethroids usually regarded as possible alternatives in case of permethrin resistance. In addition to bioassays made with field-collected mosquitoes, we also evaluated the frequency of the *kdr* allele and compared it with the level of resistance to the different insecticides.

MATERIALS AND METHODS

Samples and strains of mosquitoes

Larvae of *An. gambiae* s.s. were collected in natural breeding sites from 6 localities of Côte d'Ivoire (Fig. 1). The samples from Abidjan were collected within the urban area of the capital of Côte d'Ivoire. Samples from Korhogo and Yaokoffikro were collected in periurban areas of these cities. The 3 other localities were sampled in rural areas, including Kafine and M'be from the southern savanna area and Zaïpobly from the forested area (Fig. 1).

All tests were carried out either on nonbloodfed 2-5-day-old females emerged from field-collected larvae or on females emerged from the 1st progeny brood. Susceptibility of natural populations was compared with that of 2 laboratory strains of *An. gambiae* s.s. with the same lots of impregnated papers: Kisumu, a susceptible reference strain originated from Kenya and maintained for many years in the laboratory; and Kou, a selected resistant strain, originating from a natural pyrethroid- and

¹ ORSTOM, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

² OCCGE, Institut Pierre Richet, BP 1500, Bouake 01, Côte d'Ivoire.

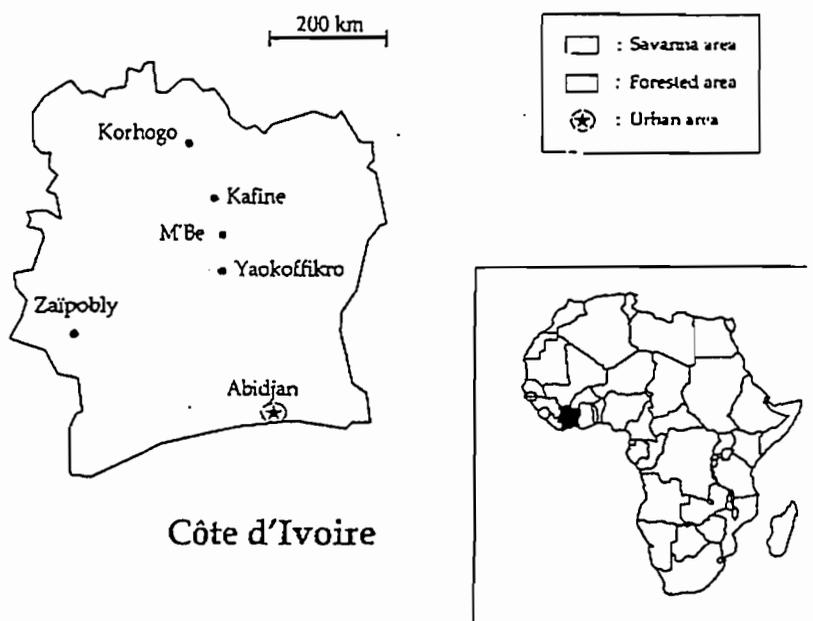


Fig. 1. Map of Côte d'Ivoire showing the localities of the 6 collecting sites of *Anopheles gambiae* s.s. situated either in the savanna area (white), forested area (shaded), or urban area (star).

DDT-resistant population collected in Burkina Faso in 1995. This strain was laboratory selected with permethrin and made homozygous for *kdr*. Colonies of both Kisumu and Kou strains were maintained at Bouake (Institut Pierre Richet, OCCGE) where all bioassays were made.

Resistance tests

Bioassays were carried out with WHO test kits for adult mosquitoes (World Health Organization 1970) with 7 insecticides of technical grade quality. Five were pyrethroids: cyfluthrin (92%) (Bayer, Leverkusen, Germany), λ -cyhalothrin (84.1%) (Zeneca, Bracknell, United Kingdom), α -cypermethrin (99.5%) (Phytagri, Geneva, Switzerland), deltamethrin (99.8%) (Agrevo, Berkhamsted, United Kingdom), and permethrin 25/75 (93.8%) (Agrevo). One insecticide was a nonester pyrethroid, etofenprox (99%) (Mitsui Toatsu, Tokyo, Japan), and 1 was an organochlorine, DDT (100%) (Sigma, St. Quentin Fallavier, France).

Impregnated papers were prepared in our laboratory with acetic solutions and silicone oil (Dow Corning 556) as a carrier. Impregnations were made on the basis of 3.6 mg of oil per cm². Whatman filter paper sheets (12 × 15 cm) were impregnated with a mix of 0.7 ml of silicone oil and 1.3 ml of insecticide acetic solution. Papers were stored at 4°C and were not used more than 3 times. The concentrations used were those recommended by WHO for deltamethrin (0.025%), λ -cyhalothrin (0.1%), permethrin (0.25%), and DDT (4%). Additional

tests were made at higher concentrations for permethrin (1%). The 3 other insecticides, α -cypermethrin, cyfluthrin, and etofenprox, were used at 0.0025%, 0.05%, and 0.25% concentrations, respectively, providing systematically 95–100% mortality for the susceptible reference strain. Then, for most insecticides, we considered the threshold for resistance below 95% mortality.

Laboratory tests were made with lots of 25 adult females in WHO test tubes with at least 4 replicates per bioassay. Exposure time was 60 min with tubes maintained in the normal vertical position. After exposure, mosquitoes were kept under observation for 24 h, supplied with 10% honey solution, and maintained at a temperature around 26°C with about 80% RH. Mortality was read after this 24-h period.

Allelic frequency of *kdr* in field samples

*PCR amplification for *kdr* mutation:* Genotypes for *kdr* mutation were determined according to Martinez-Torres et al. (1997). For individual mosquitoes, DNA was extracted from 2–3 legs with 5% Chelex[®] in water solution. The PASA tests were made in buffer containing deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase, the 2 primers for the control band, and the 2 specific primers for susceptible allele and *kdr* mutation. The lengths of amplified sequences were 293 bp for the control band, 195 bp for the *kdr* allele, and 137 bp for the susceptible allele, allowing an easy definition of genotypes.

8
CA
t

MARCH 1999

PYRETHROID CROSS-RESISTANCE OF *AN. GAMBIAE*

PCR for identification of species: Although the *kdr* mutation has been found so far only in *An. gambiae* s.s., specimens from the field (except 1 locality, Korhogo) were identified with specific primers according to Scott et al. (1993).

Tests with deltamethrin-impregnated nettings

Assays were made with impregnated multifilament polyester nettings by the WHO standard protocol (World Health Organization 1996). Bed-nets were impregnated at the concentration of 25 mg/m² with deltamethrin 2.5% SC (K-Othrine) diluted in deionized water. Lots of 5 females were exposed for 3 min under WHO plastic cones. A total of 12–18 replicates were made for each test. The number of knockdown mosquitoes was evaluated 60 min after exposure.

Statistical analysis

In order to assess if *kdr* gene was the only factor responsible for resistance, the relationship between *kdr* and resistance was investigated. Coefficients of correlation were calculated between the *kdr* allelic frequency in different populations and the corresponding percentage of surviving mosquitoes for each insecticide. To determine if the correlation was significant, the null hypothesis ($r = 0$, i.e., variable uncorrelated) was tested by a *t*-test with $n - 2$ degrees of freedom ($t = \sqrt{[n - 2]/[1 - r^2]}$). The level of significance of each test was adjusted to take into account the other tests by the sequential procedure of Bonferroni (Rice 1989).

RESULTS

Resistance levels of field samples from Côte d'Ivoire

Mortality after 24 h for all insecticides ranged between 98% and 100% with the reference susceptible strain Kisumu (Fig. 2). On the contrary, much lower mortality rates were observed for the Kou resistant strain, with less than 15% mortality for all insecticides except λ -cyhalothrin.

Among the 6 field samples tested, only 1, Zaïpobly, displayed a normal susceptibility to deltamethrin and λ -cyhalothrin; however, it showed a lower mortality with permethrin 0.25%. This sample was not tested with other insecticides because the number of individuals found in the field was not enough. The M'be sample was resistant to several insecticides, but a high mortality was observed with λ -cyhalothrin and DDT. The 4 other samples were cross resistant to all tested pyrethroids, etofenprox, and DDT. When the samples were sorted according to their average mortality, the increasing order of resistance among samples was Abidjan, Kafine, Yaokoffikro, and Korhogo (Fig. 2). The latter even appeared nearly as resistant as the Kou selected strain.

Allelic frequency of *kdr* in natural populations

All specimens except those from Korhogo were identified by PCR and were found to be *An. gambiae* s.s. The *kdr* gene was detected in 5 out of 6 samples tested (Table 1) and was absent in Zaïpobly (26 individuals tested). In resistant populations, allelic frequencies of *kdr* ranged from 4% to 95%. The order of *kdr* allelic frequency was generally identical to the rank of resistance level obtained with bioassays.

To assess if *kdr* was the main factor conferring cross-resistance to all insecticides, attempts were made to correlate its allelic frequency with the mosquito survival rates for the different insecticides (Table 2). When each insecticide was considered separately, the correlation was significant at 95% with 6 out of the 7 tested (except α -cypermethrin). However, by the sequential Bonferroni procedure, which increases the statistical power of detecting false H₀ (type I error) when simultaneous tests are made, a significant correlation at 95% was found for only 3 insecticides, λ -cyhalothrin, etofenprox, and DDT.

Impact of resistance on mortality with deltamethrin-impregnated nettings

Tests were made with the 2 most resistant samples, Korhogo and Yaokoffikro (Table 3). Sixty minutes after the 3-min insecticide exposure, knockdown mosquitoes ranged from only 4% for those from Korhogo to 21% from Yaokoffikro in comparison with 100% for the susceptible strain (Kisumu). After 24 h, no mortality was observed for the Korhogo specimens and only 10% for the Yaokoffikro ones versus 100% for the susceptible strain.

DISCUSSION

Anopheles gambiae s.s. from only 1 (Zaïpobly) of the 6 study sites sampled were fully susceptible to pyrethroids. However, in this locality, 13% survived at permethrin 0.25%, which is comparable with susceptible populations. In fact, the diagnostic concentration of 0.25% proposed by WHO for permethrin is too low when using the recommended isomeric ratio of 25% cis/75% trans. In the Gambia, 9% survival with permethrin 0.25% (isomeric ratio not known) was observed in a population considered as susceptible (Hemingway et al. 1995). A mortality rate of 80%–90% was also observed in wild susceptible populations from various countries in Africa, which corresponded to the mortality range of a susceptible laboratory strain (Chandre et al. 1991). In this study, the highest mortality rates were systematically observed with λ -cyhalothrin 0.1%, most likely because this diagnostic concentration currently proposed by WHO (1995) was too high. When the M'be sam-

set to
not touch

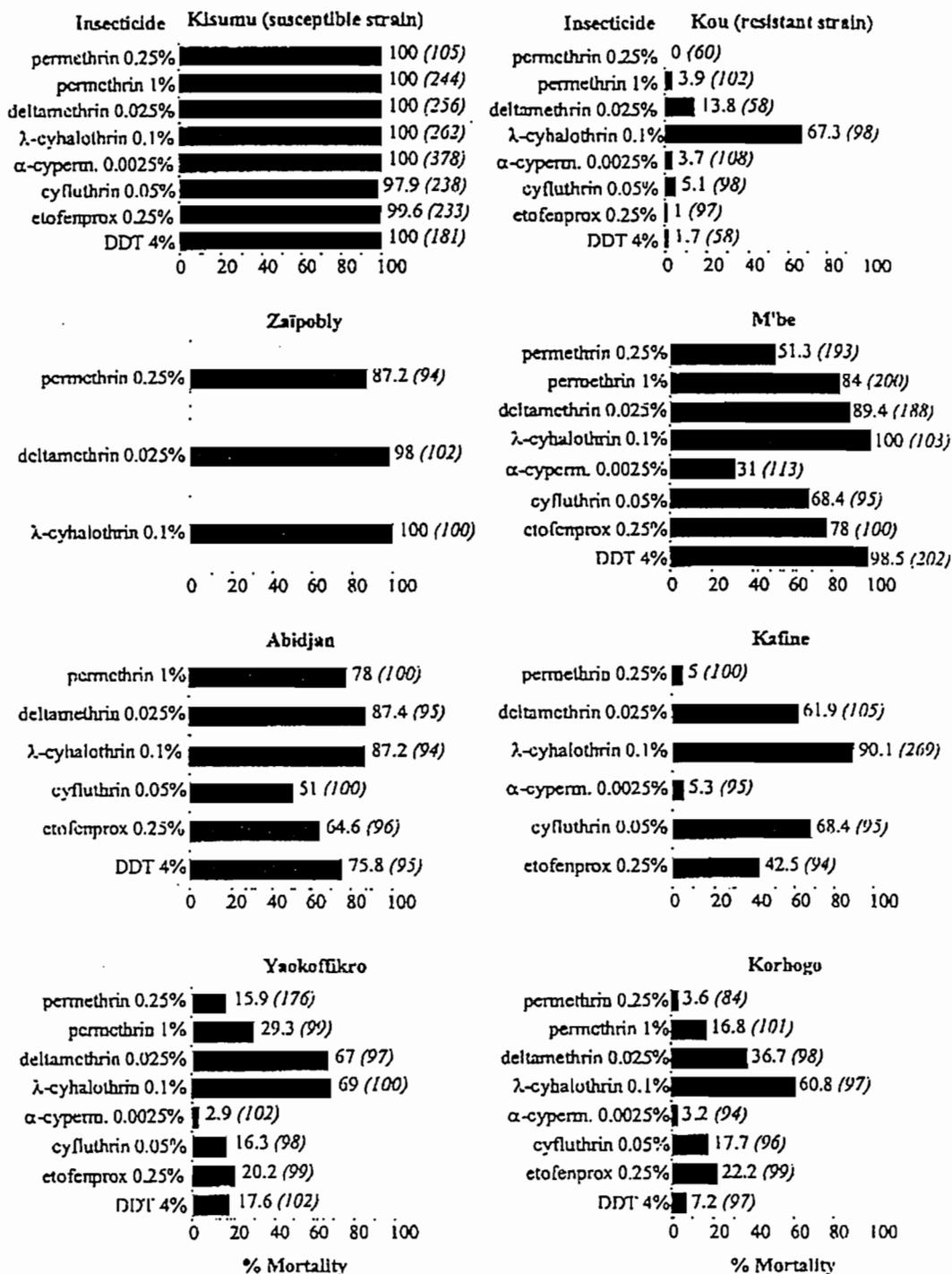


Fig. 2. Percentages of mortality to WHO tests with different insecticides for 6 field samples of *Anopheles gambiae* s.s., a susceptible reference strain (Kisumu), and a resistant one (Kou). Number of mosquitoes assayed in brackets.

MARCH 1999

PYRETHROID CROSS-RESISTANCE OF *AN. GAMBIAE*

Table 1. Genotypes of *Anopheles gambiae* and allelic frequency of *kdr* in natural populations of Côte d'Ivoire.

Sample	Genotype			F(R) ¹	n ²
	SS	RS	RR		
Zaipobly	26	0	0	0%	26
M'be	63	3	1	3.7%	67
Abidjan	10	13	4	38.9%	27
Kafine	12	6	10	46.4%	28
Yaokoffikro	5	3	22	78.3%	30
Korhogo	1	1	28	95.0%	30

¹ Allelic frequency of *kdr* in %.

² Number of mosquitoes assayed.

ple was tested, a low but detectable resistance level to most of the pyrethroid insecticides was found. However, this sample would have been regarded as fully susceptible if tested only with λ -cyhalothrin.

Furthermore, a collaborative study was initiated by WHO after this study to determine the proper diagnostic concentrations of pyrethroids for the most important mosquito vector species. In the framework of this study, our laboratory (WHO Collaborating Centre for Vector Control) has found that the mean mortality rate with λ -cyhalothrin 0.01% was 98.7% with susceptible *An. gambiae* s.s. (4 replicates, 400 individuals tested, impregnated papers provided by WHO). The concentrations providing 100% mortality ranged from 0.01% to 0.025%. Therefore, the concentration of 0.1% mentioned above is obviously too high, and the correct diagnostic concentration for λ -cyhalothrin should be 0.05% (twice our highest concentration value). Similarly, the correct diagnostic concentration for permethrin 25/75 would be 1% instead of the 0.25% proposed by WHO using permethrin with a different isomeric ratio. In accordance with both Hemingway (1995) and our present study, the concentration used for etofenprox (0.25%) was shown to be discriminant for anophelines. These results underline the necessity to standardize the case of

Table 3. Knockdown (Kd) and mortality of *Anopheles gambiae* after 3-min exposure to deltamethrin nettings (25 mg/m²) for 2 field-resistant samples (Korhogo, Yaokoffikro) and susceptible reference strain (Kisumu).

Sample	Kd at 60 min	Mortality	n
Kisumu	100%	100%	60
Korhogo	3.9%	1.3%	77
Yaokoffikro	21.3%	10.1%	89

diagnostic concentrations for monitoring mosquito resistance in the field.

A broad spectrum of resistance to various pyrethroids and DDT was conferred by the *kdr* mutation, as shown from the results obtained with the Kou strain, homozygous for *kdr*. The cross-resistance pattern observed in 5 populations from Côte d'Ivoire was also clearly associated with the presence of the *kdr* mutation. The strong correlation observed between *kdr* allelic frequency and survival of mosquitoes with DDT, λ -cyhalothrin, and etofenprox indicated that *kdr* was the main resistance factor for these 3 insecticides.

On the contrary, the correlation for other tested insecticides was not as significant, although an increase of *kdr* frequency was clearly associated with a decreased mortality to pyrethroids. Although this poor correlation could be attributed to the small number of samples considered, it suggested, above all, that *kdr* was not the only resistance mechanism involved. More interestingly, although the *kdr* frequency in the M'be sample was low (4%) and mortality with DDT high as expected (98.5%), a high survival rate was observed with α -cypermethrin (69%). Considering that for several years DDT has not been used in Côte d'Ivoire, the high resistance observed indicates that the *An. gambiae* s.s. populations were submitted to a strong pyrethroid selection pressure. Possibly, this pressure selected more specific pyrethroid resistance mechanisms, such as metabolic detoxification. Oxidase-based metabolism through P450 cytochromes and, to a lesser extent, esterases

Table 2. Correlation coefficients between *kdr* allelic frequency (Table 1) and corresponding percentage of population survival rate (Fig. 2) for different insecticides.

Insecticide	Correlation coefficient	t-value	P(t) ¹	n ²
Cyfluthrin 0.05%	0.883	3.257	0.0236	5
λ -Cyhalothrin 0.1%	0.977*	9.098	0.0004	6
α -Cypermethrin 0.0025%	0.898	2.880	0.0512	4
Deltamethrin 0.025%	0.853	3.263	0.0155	6
Permethrin 0.25%	0.899	3.554	0.0190	5
Permethrin 1%	0.959	4.780	0.0206	4
Etofenprox 0.25%	0.953*	5.445	0.0061	5
DDT 4%	0.986*	8.379	0.0070	4

¹ Probability of t-value with n - 2 df.

² Number of samples.

* Correlation coefficient significantly different from 0 at 95% level after sequential Bonferroni procedure.

is commonly involved in pyrethroid resistance. Pyrethroid detoxification mechanisms may not confer resistance to DDT and etofenprox (nonester pyrethroid), which have different chemical structures and metabolic pathways. This may explain why resistance to these 2 insecticides was strongly correlated to *kdr* frequencies and resistance to pyrethroids was not (except for λ -cyhalothrin because the concentration used was too high). Ongoing studies are aimed to identify the other resistance mechanism(s) involved.

As previously suggested, it is likely that the *kdr* mutation in West Africa was inherited from DDT resistance, itself induced by the agricultural use of organochlorine insecticides (Chandre et al. 1997). This resistance has probably been further enhanced by the intensive use of pyrethroids for crop protection and domestic hygiene. Although α -cypermethrin has never been used in Côte d'Ivoire for mosquito control, resistance was observed even in the M'be sample, where resistance to other pyrethroids was much lower. However, this is not surprising considering that cypermethrin accounts for 80-90% of the overall quantity of pyrethroids used for several years for cotton, with about 1 million liters applied annually in this country (Vassal, personal communication).

Pyrethroid resistance in Côte d'Ivoire should definitely be regarded as a threat for the implementation of malaria control programs with impregnated bed-nets. Field-collected mosquitoes from resistance areas were no longer killed when exposed for 3 min to nettings impregnated with deltamethrin. In addition, resistant individuals are much less susceptible to the knockdown and excito-repellent effects of pyrethroids (unpublished data). Several large-scale control programs with pyrethroid-impregnated bed-nets, such as in the Gambia (Hemingway et al. 1995) or in China (Cheng et al. 1995), did not result in the selection of resistance among anopheline populations in these areas. However, 1 case of permethrin resistance was observed in East Africa in a permethrin-impregnated bed-net area (Vulule et al. 1994). The problem may be quite different when resistance genes are already present in target populations, as found in Côte d'Ivoire. Interestingly, in 1 of the sampled localities (Kafine), the allelic frequency of *kdr* increased from 46.4% to 92.5% in only 1 year after distribution of permethrin-impregnated bed-nets (Doannio et al. 1997). However, in the same time, the malaria morbidity of children was reduced by more than 50%, which is in the order range of results obtained with impregnated bed-nets in other parts of Africa (Choi et al. 1995). These results underline the necessity to monitor pyrethroid resistance and the presence of *kdr* gene before planning and implementing malaria control programs based on the use of impregnated materials.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the following companies: Agrevo, Bayer, Mitsui Toatsu, Phytagri, and Zeneca for providing technical insecticides. We are also grateful to R. N'guessan for technical assistance. This study was supported by OCCGE, ORSTOM, and MESR (grant 92-058).

REFERENCES CITED

Chandre, F., F. Darriet, L. Manga, M. Akogbeto, O. Faye, J. Mouchet and P. Guillet. 1997. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. Bull. WHO ~~(in press)~~

Cheng, H., W. Yang, W. Kang and C. Liu. 1995. Large-scale spraying of bednets to control mosquito vectors and malaria in Sichuan, China. Bull. WHO 73:321-328.

Choi, H. W., J. G. Breman, S. M. Teutsch, S. Liu, A. W. Hightower and J. D. Sexton. 1995. The effectiveness of insecticide-impregnated bed nets in reducing cases of malaria infection: a meta-analysis of published results. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:377-382.

Doannio, J., J. Dossou, M. C. Henry, I. Nzeyimana, F. Darriet, P. Guillet and P. Carnevale. 1997. Pyrethroid resistance in *An. gambiae* s.s. and efficacy of impregnated bednets. First results of a field trial in West Africa. Proc. Int. Conf. Bednets and Other Insecticide Treated-Materials. (1997) 10:29-31

Elissa, N., J. Mouchet, F. Rivière, J. Y. Meunier and K. Yao. 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 73:291-294.

Farnham, A. W. 1973. Genetics of resistance of pyrethroid-selected houseflies, *Musca domestica* L. Pestic. Sci. 4:513-520.

Farnham, A. W. 1977. Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. Pestic. Sci. 8:631-636.

Hemingway, J. 1995. Efficacy of etofenprox against insecticide susceptible and resistant mosquito strains containing characterized resistance mechanisms. Med. Vet. Entomol. 9:423-426.

Hemingway, J., S. W. Lindsay, G. J. Small, M. Jawara and F. H. Collins. 1995. Insecticide susceptibility status in individual species of *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in an area of The Gambia where pyrethroid impregnated bednets are used extensively for malaria control. Bull. Entomol. Res. 85:229-234.

Martinez-Torres, D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Berge, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur and D. Pauron. 1997. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol. Biol. ~~(in press)~~

Rice, W. R. 1989. Analysing tables of statistical tests. Evolution 43:223-225.

Scott, J. A., W. G. Brogdon 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.

Vulule, J. M., R. F. Beach, F. K. Atieli, J. M. Roberts, D. L. Mount and R. W. Mwangi. 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.

9

Au: abbreviat ok?? (per BIOSIS sources) updat ?? - CE

77(2): in pr

Au: OK as set?? (Vol. no. + page num ??) - CE

23-31 october (pages were numbered)

8

Au: update? 7: 179184

9

MARCH 1999

PYRETHROID CROSS-RESISTANCE OF *AN. GAMBIAE*

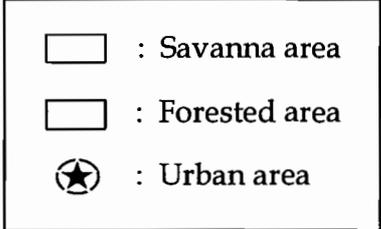
World Health Organization. 1970. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Dix-septième rapport du comité OMS d'experts des Insecticides. Technical Report Series 443. Geneva, Switzerland.

World Health Organization. 1995. Supplies for monitoring insecticide resistance in disease vectors. Procedure

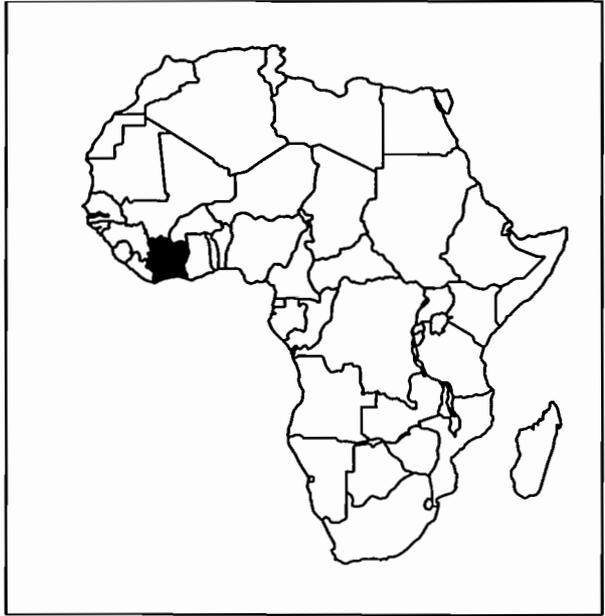
and conditions. WHO/MAL/95.1073, WHO/CTD/VBC/95.998. Geneva, Switzerland.

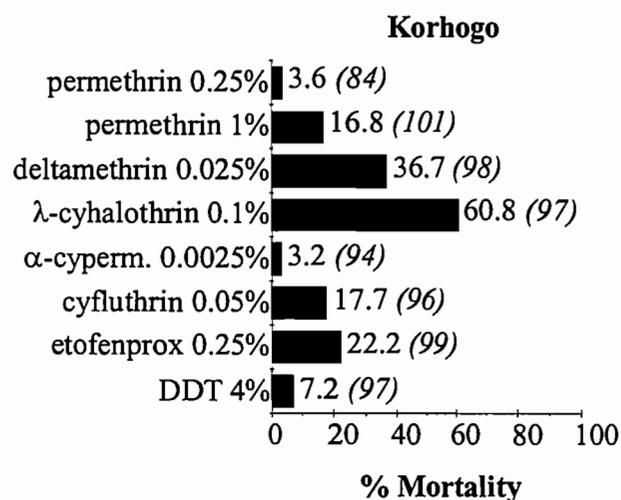
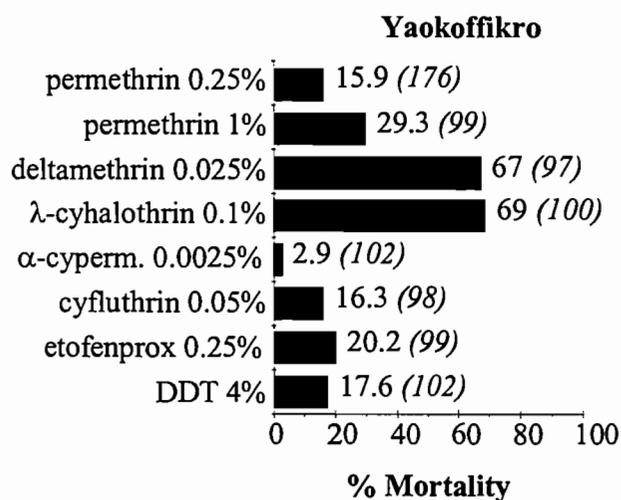
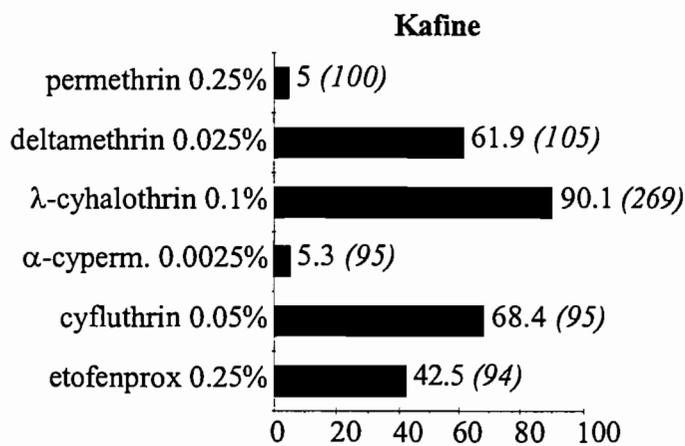
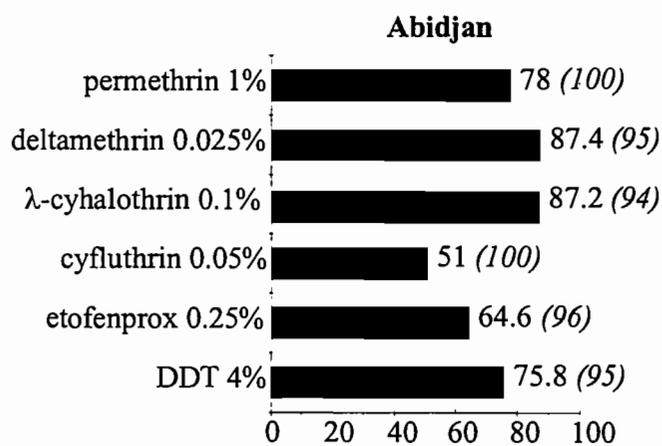
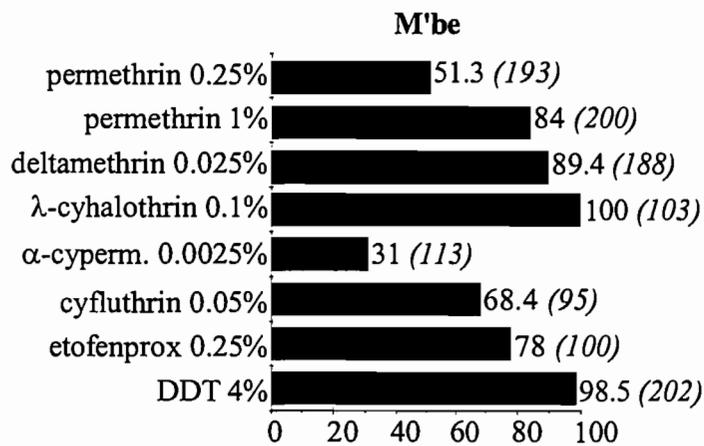
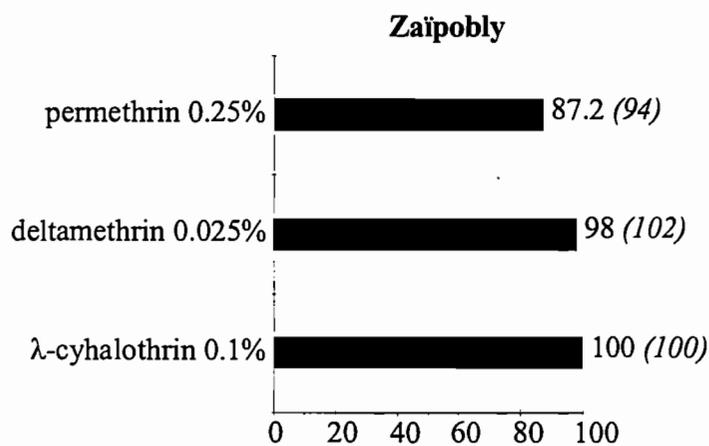
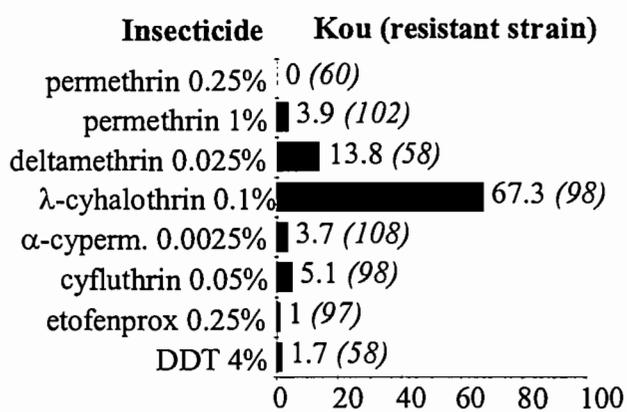
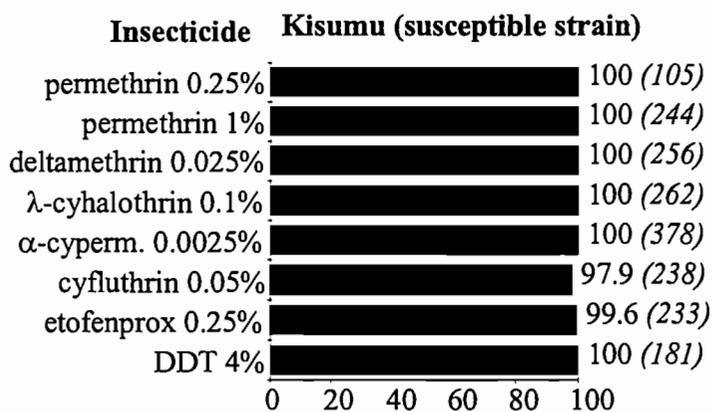
World Health Organization. 1996. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/WHOPES/IC/96.1. Geneva, Switzerland.

200 km



Côte d'Ivoire





Article 8

Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S., Guillet P. 1998.
Modifications of pyrethroid effects induced by *kdr* mutation in *An. gambiae* s.s. *Medical & Veterinary Entomology*. (soumis).

MODIFICATIONS OF PYRETHROID EFFECTS INDUCED BY
KDR MUTATION IN *ANOPHELES GAMBIAE* S.S.

F. CHANDRE,¹ F. DARRIET,² S. DUCHON,¹ L. FINOT,¹ S. MANGUIN¹
and P. GUILLET¹

¹ ORSTOM, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1,
France

² OCCGE, Institut Pierre Richet, BP 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire.

Correspondence: Dr F. Chandre, ORSTOM, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, BP 5045,
34032 Montpellier cedex 1, France

Abstract. Some of the main effects conditioning the efficacy of pyrethroids for bednet impregnation are excito-repellency, rapid knockdown and mortality against mosquitoes. These various effects were evaluated on pyrethroid resistant *An. gambiae* s.s. with different genotypes for *kdr* mutation. Using topical applications of permethrin, it was shown that *kdr* conferred to adults a resistance level ranging from 30 to 40 fold. Using WHO test kits for adult mosquitoes, resistance to mortality and knockdown effect were found to be inherited in a semi-recessive way. *Kdr* mutation was also found associated with resistance to the irritant effect of permethrin and this character was codominant. Since *kdr* has induced resistance to the most important effects of pyrethroids, serious concerns were raised about efficacy of impregnated bednets against malaria vectors in resistance areas. However, laboratory cage and experimental hut studies showed that permethrin and deltamethrin remained effective against resistant *An. gambiae* s.s. at least for personal protection. They still prevented from mosquito bites and provided relatively high mortality even with a field anopheline population with a high *kdr* allelic frequency (94%). This paradoxical result was explained by the antagonistic effects caused by *kdr*. Resistant mosquitoes can tolerate higher dose of permethrin but in the same time, they also tolerate a more prolonged contact with an impregnated support. When searching to bite through a bednet they uptake more insecticide than susceptible individuals which are rapidly irritated, leading to a relatively important lethal effect and preventing them to bite. These preliminary results need to be confirmed at the operational level, but they are encouraging for implementation of impregnated bednet programs in areas where *kdr* is involved as the main resistance mechanism in malaria vectors.

Key words. *Anopheles gambiae*, pyrethroid, resistance, *kdr*, impregnated bednet, malaria control.

Short title for page headlines. Pyrethroid effects on resistant *An. gambiae*

Introduction

Vector control is an important component of the WHO global strategy for malaria prevention and its main objective is to interrupt transmission of the parasite using indoor residual spraying or pyrethroid impregnated bednets (ITNs).

Anopheles gambiae s.l. Giles is the major malaria vector in Africa, where 90% of the world cases occur. Resistance of *An. gambiae* s.s. to pyrethroids was first observed in Côte d'Ivoire (West Africa) by Elissa et al. (1993) with a significantly reduced mortality for permethrin and a lower knockdown effect for deltamethrin and lambda-cyhalothrin. More recently, knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroids and DDT was observed in several countries from West Africa (Chandre et al. 1999a). Investigations on the target site for pyrethroids and DDT showed that this resistance was associated with a single point mutation on the gene coding for the sodium channel, resulting in the change of one amino-acid (Martinez-Torres et al. 1998). As expected, this mutation conferred cross resistance to a wide range of pyrethroids (Chandre et al. 1999b).

In addition to their safety and lethal effect at very low doses, pyrethroids present the advantages of acting very rapidly (knockdown effect) and being excito-repellent for mosquitoes. These are the reasons why, only pyrethroids can currently be used for material impregnation. The overall effect of pyrethroids impregnated on bednets or curtains is as much as excito-repellent than lethal. In the case of personal protection, the excito-repellent effect with a rapid knockdown is even more important than the killing effect. In this regard, it was interesting to check whether these different effects could be modified by pyrethroid resistance and what consequences it may have on protective effect of impregnated nettings. At last, modification of resistant mosquito behaviour with impregnated nettings was studied both in a cage simulating field conditions and in the field using experimental huts.

Material and methods

Mosquitoes

Three laboratory and one field strains of *Anopheles gambiae s.s.* were used:

- Kisumu, a susceptible reference strain originated from Kenya and maintained for many years in colony. This strain is homozygous susceptible (SS),
- Kou and Tola, originated from natural pyrethroid/DDT resistant populations from Burkina Faso and Côte d'Ivoire respectively. These 2 strains were laboratory selected with permethrin until becoming homozygous resistant (RR) for *kdr*.

To evaluate the phenotypic expression of *kdr* in heterozygous specimens (RS), a crossing was made between Kisumu females (SS) and Kou males (RR) in order to test the F1 progeny brood.

Preliminary investigations using impregnated nettings were also performed on a field resistant population of *Anopheles gambiae s.s.* (Yaokoffikro, Côte d'Ivoire) with a *kdr* allelic frequency of 94.4% (91.7% RR, 5.5% RS, 2.8% SS). These tests were made on 3 to 5 days old females that emerged from field collected larvae.

Taxonomic status was investigated using PCR diagnostic for species identification (Scott et al., 1993).

Insecticides

Most tests were performed with permethrin 25/75 (cis/trans isomeric ratio) of technical grade quality (93.8%) [Agrevo, Berkhamsted, UK]. Formulations of deltamethrin (K-Othrine® SC25) and permethrin (Perigen® 10%CE) were also used for impregnation of nettings and bednets.

Topical applications

To determine precisely the resistance level conferred by *kdr* on adults of *An. gambiae*, permethrin was topically applied on mosquitoes using serial dilution in acetone. Unfed females (3-5 days old) were briefly (30 sec.) anaesthetised with carbon dioxide and maintained on a cold surface (1-2°C). A micro-droplet of 0.1 µl of insecticide solution was individually poured on female thorax. Six concentrations providing a range of 0 to 100% of mortality were used with 25-30 females per concentration. Tests were

replicated three times. For each replicate, a lot of 20-30 females was systematically weighted to express lethal doses (LD) in ng per mg of mosquito body weight. Controls were made with 0.1 µl of acetone alone and control mortality was systematically under 10%. After treatment, mosquitoes were kept in plastic cups and supplied with 10% honey solution for 24 hours before mortality count. Temperature and humidity during observation time were maintained at 26°C and 80% RH.

Mortality and knockdown rates in WHO test tubes

Bioassays were carried out with WHO test kits for adult mosquitoes (WHO 1970). Impregnated papers were prepared according to Chandre *et al.* (1999a) with permethrin 25/75 at two concentrations, 0.25% and 1%. Tests were performed with batches of 20-25 unfed females (3-5 days old) in WHO test tubes with 4 replicates per bioassay. Mosquitoes were exposed 60 min to impregnated papers in tubes maintained in the normal vertical position. During exposure knockdown rates were checked at regular interval of time. After exposure, mosquitoes were supplied with honey solution and kept in observation during 24 h before mortality count. Temperature and humidity during observation time were maintained at 26°C and 80% RH. Knockdown rates were used to calculate Kd50 and Kd95 times using a log-probit analysis.

Irritant effect of permethrin

Irritant effect of permethrin was evaluated following a WHO protocol based on time for first take off as described by Mouchet and Cavalie (1961). The test consists in measuring the time spent by mosquitoes on an insecticide treated surface until first take off. Individual unfed female (3-5 days old) was introduced under a WHO plastic cone fasten on a filter paper impregnated with permethrin 1%. The time of first take off (TO) was measured after a settling period of 60 s. At the end of settling period, time was counted between first landing and the following take off. Each test was made with 30 females and replicated 3 times. Control was done with paper impregnated with carrier alone (silicone oil). Mosquitoes were clustered by classes of take-off time and cumulative frequencies of different classes were analysed upon a log time-probit model (Mouchet & Cavalie 1961).

Effect of Impregnated nettings

This test was designed to determine if resistant strain females were able to pass through a holed impregnated netting and then take blood.

Laboratory tests were performed in a cage modified by Elissa and Curtis (1995). This cage consisted in a square glass tunnel of 25x21x60 cm with 2 compartments of 20 and 40 cm in lengths separated by a piece of impregnated polyester multifilament netting 100 denier (20x20cm) fasten on a cardboard frame. Nettings were impregnated after folding them in an aluminium box and pouring insecticide diluted formulation using the exact volume retained by netting (35ml/m²). After drying up in the aluminium box, nettings were stored at room temperature. Tests were systematically done one week after impregnation. Nettings were pierced with 5 holes of 1 cm diameter (1% of total area) and placed in the tunnel cage. A guinea pig was introduced in the smaller compartment and immobilised in a small metallic cage to avoid any contact with insecticide impregnated material. About 100 unfed females (5-8 days old) were introduced at 6 p.m. in the bigger compartment. Mosquitoes were left overnight in cages placed in a dark room maintained at 28°C and 80% RH. The next morning, at 8 a.m., mortality and blood feeding rates in both compartments were checked. Tests were replicated 2 to 3 times. A control tunnel cage with untreated netting was systematically used in parallel.

Preliminary investigations to test this device were made in the ORSTOM laboratory of Montpellier to control its reproducibility and validity. In addition, further experiments were carried out in the field in Côte d'Ivoire with the objective of comparing the results obtained in tunnel cages with those from the field in experimental huts. These experiments were part of a global evaluation of the efficacy of both permethrin and deltamethrin impregnated bednets in a pyrethroid resistance area (Darriet et al., unpubl. results).

Briefly, 2 small size polyester multifilament bednets (11 m²) were impregnated with permethrin EC at 500 mg/m² and 2 with deltamethrin SC at 25 mg/m². One of each was stored in a closed room and used to cut off samples tested in tunnel cage using the above protocol. The 2 others were pierced with 225 holes of 4 cm² (2x2 cm) and hung in 2 experimental huts used every night by 2 sleepers. A range of 50 to 100 females were released in an enclosed hut and left overnight. Mortality and blood feeding rates were recorded the next morning. Tests in tunnel cages and experimental huts were done in

parallel with the same insect batches in order to compare results obtained with these two methods. Tests were done with both the susceptible strain (Kisumu) and the local field resistant population (Yaokoffikro) using adults emerged from field collected larvae. Each test was replicated 3 or 4 times during the 6 months following impregnations.

Data analysis

Data for topical application, knockdown times and irritant effect of permethrin were analysed using a log-probit software (Raymond et al. 1993), based on Finney (1971). Mortality and blood feeding rates using impregnated nettings were compared between the samples using χ^2 tests. The level of significance of each test was adjusted to take into account the other tests using the sequential procedure of Bonferroni (Rice 1989).

Results

Topical applications

LD₅₀ and LD₉₅ of susceptible mosquitoes were respectively 1.0 and 4.4 ng of permethrin per mg of mosquito (Table 1). The mean weight of adult females ranged from 1.1 to 1.5 mg. Resistance ratios for the Kou strain were 43 and 28.5 times for LD₅₀ and LD₉₅ respectively.

Mortality and knockdown in WHO test tubes

With both permethrin concentrations tested, less than 5% mortality was observed with Kou strain versus almost 100 % with the Kisumu susceptible strain (Table 2). High levels of mortality (80-84%) were recorded among heterozygous individuals (RS) obtained by crossing these two strains (F1 progeny). In addition, some tests with permethrin 1% were done with batches of susceptible homozygous (SS) and hybrid (RS) individuals in various proportions. A reduced mortality in comparison with susceptible strain was observed only when the proportion of RS was 60% and over.

On the contrary, Kd times (KdT) increased significantly for hybrids as compared to susceptible strain, whereas RR individuals were not affected by the Kd effect of permethrin at both dosages (0.25% and 1%). In tests where SS and RS were mixed, a strong correlation ($P < 0.001$) was observed between the proportion of heterozygous and KdT. However, as the variation in KdT between SS and RS was about two fold, a significant increase of KdT was not observed before the proportion of RS reaches 40%. The observed KdT_{100} , also considered in this study increased significantly in mixed samples when proportion of RS was at least 60 %.

Irritant effect of permethrin

Irritant effect of permethrin was investigated on the Kisumu, Kou strains and their hybrids (Fig. 1). The relationship between log time and probit of cumulative frequency in different classes of time until first take off was linear ($P > 0.05$). With an untreated paper, time for first take off of 50% and 95% (TO_{50}/TO_{95}) of mosquitoes were respectively 58.5 s et 1044 s with the susceptible Kisumu strain. TO_{50} and TO_{95} were 3.7 s and 16.5 s respectively on impregnated paper indicating that susceptible mosquitoes were strongly irritated by permethrin. Interestingly, pyrethroid resistance in the Kou strain was associated with resistance to irritant effect of permethrin as its TO_{50} (27.3 s) and TO_{95} (294 s) were respectively 6.4 and 17.8 times higher than the one of the susceptible strain. TO_{50} (10.1 s) and TO_{95} (71.9 s) observed with hybrids RS were exactly intermediate between those of SS and RR individuals.

Effect of impregnated nettings on resistant strains

Preliminary laboratory tests in France

For the three strains tested in control tunnel cage with non impregnated nettings, mortality rates ranged from 9% to 17%, mainly related to the presence of guinea pig and its dejections (Table 3). The proportions of mosquitoes which succeeded to pass through the net (75-83%) and take a blood meal (63-69%) were very similar. When exposed to permethrin impregnated nettings, all susceptible mosquitoes were killed and only 10% of them were able to pass through the net holes in the compartment with the guinea pig, and none of them was able to blood feed (Table 3). For both resistant strains (Tola,

Kou), a significant proportion of mosquitoes survived (41%, 18%), between 40% and 46% were able to pass through the holed nets and finally 17% and 9% took a blood meal, respectively for Tola and Kou strains.

Comparison of tunnel cages and experimental huts with susceptible strain and field resistant population

In Côte d'Ivoire, most results on mortality and blood-feeding rates were not significantly different ($P > 0.05$) when mosquitoes of the same strain were released either in tunnel cages or experimental huts. With the susceptible reference strain, very similar results were obtained in tunnel cage with netting samples impregnated in the field (Table 4) as obtained in France with netting impregnated in the laboratory (Table 3). With both permethrin 500 mg/m² and deltamethrin 25 mg/m² mortality was very high (97-100%) and blood feeding very low (0.4-3.9%).

When using resistant mosquitoes from the field, blood feeding in tunnel cage was much reduced in comparison with experimental huts (20.3% vs 60.4%). Since field mosquitoes belong to a very anthropophilic species (*Anopheles gambiae s.s.*), they are probably reluctant to take a blood meal from a guinea pig in tunnel cage. Mortality observed in hut with treated nettings was slightly higher than in tunnel (not significant) most likely because mosquitoes were more attracted to man in huts than to guinea pig in tunnel therefore they probably spent more time in contact with treated nettings. However, blood feeding rates were not different. With both pyrethroids, permethrin and deltamethrin, mortality in huts was quite high (45.4-53.9%) and blood feeding rates low (8.1-2.5% respectively).

Discussion

Several modifications of pyrethroid effects induced by *kdr* were analysed using a resistant strain of *An. gambiae* s.s. (Kou) originated from a field resistant population and laboratory selected with permethrin until homozygosity for *kdr* gene (Darriet et al. 1997, Martinez-Torres *et al.* 1998). It seems that *kdr* was the only resistance mechanism involved. Bioassays using synergists and biochemical tests failed to demonstrate any involvement of metabolic detoxification due to oxidases, esterases and glutathion-S-transferases (our unpublished data). In this study, topical applications were used to determine resistance levels. Mosquito resistance is commonly assessed by exposing adults to insecticide impregnated filter papers at a specific concentration for a given period of time which normally induces 100% mortality within susceptible individuals (discriminative concentration). Some authors used impregnated substrates with different concentrations or exposure time to compare probit-mortality regression line, but heterogeneous data were sometimes obtained, especially at high mortality rates (over 80-90 %). This is related to the heterogeneous uptake of pyrethroids by mosquitoes because of its very rapid knockdown as well as its irritant effect (Hemingway 1980, Magesa et al. 1994). On the contrary topical applications allowed to treat each mosquito with an exact amount of insecticide and then to quantify resistance level as precisely as in larval bioassays. However, this method cannot be recommended for routine tests in the field in the framework of resistance monitoring. The adults of *An. gambiae* laboratory strain had a permethrin resistance ratio of 30 (RR95) to 40 times (RR50) which was in the range of the resistance ratios induced by *kdr* in other insect species (Soderlund and Bloomquist 1990, Williamson et al. 1996). The resistance ratio observed for larvae of the same strain was significantly higher (100-300 times) (Darriet *et al.* 1997).

Resistance was unambiguously demonstrated using the WHO diagnostic filter paper test at the discriminative concentration for permethrin 25/75 (1%) with only 5% mortality and almost no Kd of exposed mosquitoes. As observed for *Culex quinquefasciatus* (Halliday and Georghiou 1985) and most insect species (see Bourguet and Raymond 1998 for review), inheritance of *kdr* in *An gambiae* was incompletely recessive with a high mortality rate of heterozygous (80%). Resistance to the

knockdown effect was also recessive because increase in knockdown times (KdT) of heterozygous (RS) individuals was only two fold compared to susceptible ones (SS), whereas no Kd effect was observed with the resistant ones (RR). In a previous survey of DDT and pyrethroid resistance of *An. gambiae* s.l. in several African countries (Chandre *et al.* 1999a), it was observed that KdT could be considered as a good indicator for an early detection of resistance since it was significantly increased in populations before any change in mortality rates was observed.

We also evaluated more precisely the KdT modifications induced by *kdr*, by testing samples of RS and SS mixed in various proportions. A strong correlation ($P < 0.001$) was observed between the RS frequency and KdT increase. However, since KdT differences between both genotypes was only two times, a significant increase was detected only when the frequency of RS individuals was over 40%. Interestingly, this difference occurred before any change in mortality which was detected with proportion of RS over 60%. This confirms the validity of using KdT as an indicator for early detection of *kdr* based resistance in the field. It should be noted that this experiment were designed to observed the evolution of knockdown in relation with the genotypes and not to reflect the case of natural populations. Indeed, When populations are at Hardy-Weinberg equilibrium the maximum possible value for RS frequency is 50% corresponding to 25% RR and 25% SS. Higher KdT were observed in some field samples, likely attributable to the presence of few RR individuals almost completely resistant to knockdown effect (RR which were not included in the referred laboratory experiment)

Kdr was associated with resistance to irritant effect of permethrin which allowed mosquitoes to support a longer contact with impregnated surface before taking off. This was also recently shown for a pyrethroid resistant strain of *An. stephensi* (Hodjati and Curtis, 1997). Resistant mosquitoes, which can tolerate higher dose, were able to uptake more insecticide by tarsal contact as they spent longer time on an impregnated substrate. Attempts were made to test this hypotheses using tunnel cage bioassays, then experimental huts in the field. Preliminary tunnel cage experiments made in Montpellier with permethrin 250 mg/m², showed that all susceptible mosquitoes died, whereas 20-40% of resistant survived. More interestingly, 40% of the resistant mosquitoes were able to cross the treated netting versus 10% for the susceptible ones indicating that

resistant mosquitoes spend effectively longer time on netting searching a way to reach the bait. Part of them were also able to take a blood meal (9-17% versus 0% for susceptible ones). These first results indicated that *kdr* could affect the efficacy of impregnated bednets but also that a high proportion of homozygous resistant individuals were effectively killed and did not succeed to pass through netting holes. Similar conclusions were reached in Côte d'Ivoire with field resistant populations using both tunnel cages and experimental huts. Mortality of field resistant mosquitoes was significantly reduced but remained high (45.4-53.9%), and blood feeding rates remained relatively low although reaching 2.5-8.1% of the mosquitoes. However, it was encouraging to note that even for a field population, where 92% of mosquitoes were *kdr* homozygous, a high mortality and low blood feeding rates were observed. These paradoxical results can partly be explained by the antagonistic actions induced by *kdr* on pyrethroid toxicity, showed in this study. Resistant mosquitoes can tolerate higher dose of permethrin but in the same time they also tolerate a more prolonged contact with an impregnated support. It is likely that when searching to cross through a bednet they uptake more insecticide than susceptible mosquitoes which are rapidly irritated, leading to a relatively good efficacy of impregnated bednet in killing resistant mosquitoes and preventing them from blood feeding. Moreover, resistance to irritant effect appeared to be codominant, whereas resistance to mortality and knockdown is semi-recessive. Then, impregnated bednets were expected to have a strong or complete efficacy against heterozygous. This could also delay the evolution of the resistance in population mildly resistant where *kdr* is essentially present at the heterozygous state.

Reduction of mosquitoes entering houses, reduction of blood feeding rates and increase of exophily are main factors conditioning the efficacy of impregnated bednets (Darriet et al. 1984). The two latter actions are directly dependent of the excito-repellent effect of pyrethroids. Comparison of different pyrethroids showed that irritant effect varied greatly from a compound to another (our unpublished results). This will have probably different impacts when used for impregnation, indicating that more investigations are necessary to evaluate this effect that had not been enough studied yet. The antagonistic actions caused by *kdr* mutation are likely to induce a relatively good efficacy of impregnated bednets for personal protection in resistance areas. However, it is difficult to predict what will be the consequences of resistance on malaria

transmission at community level. For instance, some unknown factors remained related to daily survival rate of females still alive after insecticide contact, as well as their vectorial capacity, which are main factors conditioning the transmission. In a resistance area of Côte d'Ivoire, one year after the distribution of permethrin impregnated bednets, malaria morbidity of children was reduced by more than 50% (Doannio et al. 1997) which is similar to results obtained in areas where mosquitoes are susceptible (Choi et al. 1995). Preliminary results of small scale field trials in Benin and Côte d'Ivoire indicated that impregnated bednets seemed to hold a good efficacy against resistant mosquitoes (Guillet et al. 1999). However, further studies are needed to confirm these results at operational level. In addition it is essential to evaluate how resistance will evolve if another mechanism is present, as it was recently suggested for field populations of Côte d'Ivoire (Chandre *et al.* 1999b).

Acknowledgments

We wish to thank Agrevo, Berkhamsted, UK for providing insecticides. We are also grateful to D. Boucharinc, M. Malivert, R. N'guessan, J. Ti A Hing, for technical assistance. This study was supported by OCCGE, ORSTOM, WHO and MESR (Grant No. 92-058).

References

- Bourguet, D. & Raymond, M. (1998) The molecular basis of dominance relationships: the cases of some recent adaptive genes. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 103-122.
- Chandre, F., Darriet, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. & Guillet, P. (1999a) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae s.l.* *Bulletin of the World Health Organization*, In press.
- Chandre, F., Darriet, F., Manguin, S., Brengues, C., Carnevale, P. & Guillet, P. (1999b) Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Accepted.
- Choi, H.W., Breman, J.G., Teutsch, S.M., Liu, S., Hightower, A.W. & Sexton, J.D. (1995) The effectiveness of insecticide-impregnated bed nets in reducing cases of malaria infection: a meta-analysis of published results. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **52**, 377-382.
- Darriet, F., Guillet, P., Chandre, F., N'Guessan, R., Doannio, J.M.C., Rivière, F. & Carnevale, P. (1997) Présence et évolution de la résistance aux pyréthrinoides et au DDT chez deux populations d'*Anopheles gambiae s.s.* d'Afrique de l'Ouest. *World Health Organization*, WHO/CTD/VBC/97.1001, WHO/MAL/97.1081, 15 p.
- Darriet, F., Tho Vien, N., Robert, V. & Carnevale, P. (1984) Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria. *WHO/VBC/84.899*, *WHO/MAL/84.1008*, 20 p.
- Doannio, J., Dossou, J., Henry, M.C., Nzeyimana, I., Darriet, F., Guillet, P. & Carnevale, P. (1997). *Pyrethroid resistance in An. gambiae s.s. and efficacy of impregnated bednets. First results of a field trial in West Africa.* In International Conference on Bednets and Other Insecticide Treated-Materials: Washington, DC.
- Elissa, N. & Curtis, C.F. (1995) Evaluation of different formulations of deltamethrin in comparison with permethrin for impregnation of netting. *Pesticide Science*, **44**, 363-367.

- Elissa, N., Mouchet, J., Rivière, F., Meunier, J.Y. & Yao, K. (1993) Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **73**, 291-294.
- Finney, D.J. (1971) Probit analysis. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Guillet, P., Akogbeto, M., Darriet, F., Chandre, F. & Carnevale, P. (1998) Pyrethroid resistance and malaria control in West Africa: Good news from the field. In preparation.
- Halliday, W.R. & Georghiou, G.P. (1985) Inheritance of resistance to permethrin and DDT in the southern house mosquito (Diptera: culicidae). *Journal of Economic Entomology*, **78**, 762-767.
- Hemingway, J. (1980) Modification of the adult resistance test kit to measure knockdown rates. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 677.
- Hodjati, M.H. & Curtis, C.F. (1997) Dosage differential effects of permethrin impregnated into bednets on pyrethroid resistant and susceptible genotypes of the mosquito *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 368-372.
- Magesa, S.M., Aina, O. & Curtis, C.F. (1994) Detection of pyrethroid resistance in *Anopheles* mosquitos. *Bulletin of the World Health Organisation*, **72**, 737-740.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. & Pauron, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, **7**, 179-184.
- Mouchet, J. & Cavalie, P. (1961) L'irritabilité vis à vis du DDT d'*Anopheles gambiae* et d'*A. funestus* dans le Nord-Cameroun. *Rivista di Malariologia*, **40**, 1-27.
- Raymond, M., Prato, G. & Ratsira, D. (1993) *Probit analysis of mortality assays displaying quantal response*. Licence L93019. Praxème: 34680 St. Georges d'Orques, France.
- Rice, W.R. (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.

Scott, J.A., Brogdon, W.G. & Collins, F.H. (1993) Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**, 520-529.

Soderlund, D.M. & Bloomquist, J.R. (1990) *Molecular mechanisms of insecticide resistance*, In Pesticide resistance in arthropods, pp. 58-96., Roush, R.T. & Tabashnik, B.E. (eds). Chapman and Hall, New York.

WHO (1970) *Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Dix-septième rapport du comité OMS d'experts des Insecticides*. Technical Report Series no. 443, 306 pp. World Health Organization, Geneva.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Castells, N. & Devonshire, A.L. (1996) *Analysis of Sodium Channel Gene Sequences in Pyrethroid-Resistant Houseflies*, In Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance, pp. 52-61., Brown, T.M. (ed), Vol. 645: ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC.

Table 1. Log dose-probit mortality data with permethrin on *An. gambiae* s.s. adults using topical applications

Strains	LD ₅₀ (ng/mg)	LD ₉₅ (ng/mg)	RR ₅₀	RR ₉₅	N
Kisumu	1.024 (0.876-1.184)	4.447 (3.050-6.540)	--	--	480
Kou	43.988 (39.563-48.267)	126.730 (109.161-154.853)	43.0	28.5	559

LD_{50/95}, Lethal doses in nanograms per mg of mosquito and their 95% confidence intervals in brackets

RR_{50/95}, Resistance ratio at LD_{50/95} (Kou LD_{50/95}/ Kisumu LD_{50/95})

N, Total number of mosquitoes

Table 2. Relationship between time for knockdown (KdT) and mortality rate in susceptible (SS), resistant homozygous (RR), and heterozygous (RS) strains for *kdr*

Strains	KdT ₅₀ (mn)	KdT ₉₅ (mn)	KdT ₁₀₀ obs. (mn)	Mortality	N
Permethrin 0.25%					
Kisumu (SS)	23.3 (22.1-24.4)	42.0 (39.2-45.9)	80	98.6 %	100
Kisumu x Kou (RS)	40.1 (38.8-41.5)	62.2 (58.3-67.6)	> 80	84.0 %	75
Kou (RR)	No Kd*	No Kd	No Kd	0 %	100
Permethrin 1%					
Kisumu (SS)	11.4 (10.9-11.9)	18.2 (16.9-20.4)	25	100 %	200
95% SS + 5% RS	9.6 (8.4-10.5)	19.1 (17.3-22.1)	30	99.0 %	80
90% SS + 10% RS	11.6 (10.8-12.2)	19.5 (17.4-23.6)	20	100 %	80
80% SS + 20% RS	12.0 (11.2-12.7)	21.4 (19.6-24.1)	30	100 %	80
60% SS + 40% RS	14.4 (13.7-15.2)	26.3 (24.2-29.5)	35	100 %	79
40% SS + 60% RS	16.6 (15.8-17.4)	29.3 (27.1-32.3)	50	91.3 %	80
Kisumu x Kou (RS)	20.7 (19.9-21.5)	32.5 (30.7-35.0)	60	80.0 %	102
Kou (RR)	No Kd	No Kd	No Kd	5.0 %	100

*, Less than 5% of Kd after one hour exposure

N, Total number of mosquitoes

Table 3. Effect of nettings impregnated with permethrin (250 mg/m²) in tunnel cage on susceptible strain (Kisumu) and *kdr* homozygous resistant strains (Tola, Kou) of *An. gambiae s.s.*

Strains		Mortality	Passed		N
			Engorged	through net	
Kisumu (SS)	Control	16.0 %	82.0 %	69.0 %	200
	Permethrin	100 %	10.1 %	0 %	214
Tola (RR)	Control	9.2 %	83.0 %	69.5 %	282
	Permethrin	58.7 %	45.8 %	16.8 %	310
Kou (RR)	Control	17.0 %	75.0 %	62.8 %	328
	Permethrin	81.7 %	39.9 %	8.7 %	389

N, Total number of mosquitoes

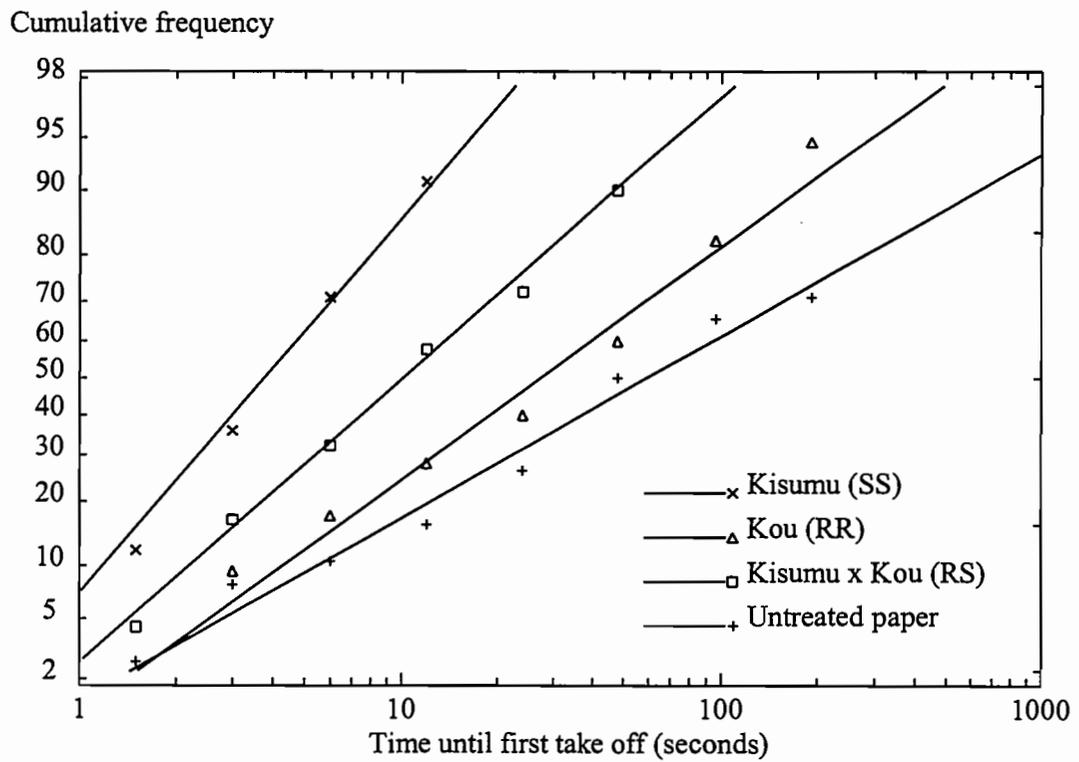
Table 4. Effect of bednets impregnated with permethrin (500 mg/m²) or deltamethrin (25 mg/m²) in tunnel cage and experimental huts on susceptible strain (Kisumu) and field resistant population (Yaokoffikro) of *An. gambiae s.s.*

Mosquitoes	Insecticide	Tunnel cage			Experimental Hut		
		Mortality	Blood Fed	(N)	Mortality	Blood Fed	(N)
Kisumu	Control	14.3 %	60.4 %*	(265)	6.3 %	16.7 %	(126)
	Permethrin	100 %*	0.4 %	(237)	94.6 %	1.3 %	(148)
	Deltamethrin	97.4 %	3.9 %	(232)	90.7 %	0.0 %	(107)
Yaokoffikro	Control	11.0 %*	20.2 %	(291)	4.1 %	29.2 %	(247)
	Permethrin	36.5 %	6.7 %	(282)	45.4 %	8.1 %	(210)
	Deltamethrin	46.9 %	3.5 %	(289)	53.9 %	2.5 %	(198)

*, significant differences (P<0.05) between values for tunnel and experimental huts

N, Total number of mosquitoes

Figure 1. Time (in seconds) until first take off of 2-5 days old non blood fed females of *An. gambiae* s.s. exposed to 1% permethrin impregnated paper.



Insecticide resistance of *Anopheles gambiae* Giles and *Culex pipiens quinquefasciatus* Say in West Africa and operational implications

SUMMARY

Studies on insecticide resistance provide data on the evolution processes involved in the adaptation of insects to environmental changes. They have also an impact in terms of pest control. A knowledge of the factors conditioning resistance evolution is a prerequisite for implementation of strategies intending to manage insecticide resistance for a better control of insects which are vector of diseases or agricultural pests.

Our study was performed on two mosquito species playing a major role in public health, *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex pipiens quinquefasciatus*. We worked on the characterization of resistance mechanisms and we studied some of the factors allowing to analyse field situations observed in West Africa and to some extent to predict their evolution.

In Côte d'Ivoire and Burkina Faso, *C. p. quinquefasciatus* populations disclosed various levels of resistance to three main insecticides classes (organophosphates, carbamates, pyrethroids). Resistance was associated with several mechanisms, including increased metabolism (esterases, mono-oxygenases) and target modifications (*Ace.1^R*, *kdr*). Taking local dispersal of these mechanisms into account, it was possible to envisage different control strategies for this species.

Study of neutral genes polymorphism showed that within cities *C. p. quinquefasciatus* populations were not differentiated and could be considered to be panmictic units. On the contrary, populations were strongly differentiated between cities, and differentiation increased with geographic distance. However, the presence of gene flow was attested by the spread of resistance genes at regional level.

Pyrethroid resistance of *An. gambiae* s.s., a major malaria vector, was detected in several countries of West Africa. This resistance was associated with a single mutation on target site of these insecticides (*kdr* gene). The impact of this mutation on mosquito behaviour in presence of insecticides was investigated attempting to assess its operational implications. It was concluded that resistance caused by the *kdr* mutation would probably not be an obstacle to implementation of malaria control programs based on the use of pyrethroid impregnated bednets. These results were confirmed in terms of personal protection at the experimental level and in the field.

These research programs need to be pursued at an operational level in order to determine the modes of circulation of resistance genes. This would allow us to elaborate adapted strategies for a better control of mosquito vectors of tropical diseases. Such research is well in accordance with the scientific objectives of the future "Centre de Biologie et de Gestion des Populations".

Keywords: *Anopheles gambiae* - *Culex pipiens quinquefasciatus* - insecticides - resistance - gene flow - vector control - malaria - Africa - Burkina Faso - Côte d'Ivoire.

Résistance d'*Anopheles gambiae* Giles et de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles

RESUME

L'étude de la résistance aux insecticides apporte des informations sur les processus évolutifs qui permettent aux insectes de s'adapter face aux modifications de leur environnement. Elle présente également un intérêt pratique majeur en matière de lutte. La connaissance des facteurs qui conditionnent l'évolution de la résistance est un préalable indispensable à la mise au point de stratégies de lutte visant à maîtriser les phénomènes de résistance aux insecticides pour améliorer le contrôle des populations d'insectes, vecteurs de maladies ou ravageurs en agriculture.

Notre étude a porté sur deux espèces de moustiques présentant un intérêt majeur en santé publique *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex pipiens quinquefasciatus*. Nous avons abordé la caractérisation des mécanismes de résistance impliqués et l'étude de certains facteurs qui permettent d'analyser les situations observées en Afrique de l'Ouest et dans une certaine mesure d'en prévoir l'évolution.

En Côte d'Ivoire et au Burkina Faso les populations de *C. p. quinquefasciatus* sont à des degrés divers résistantes aux trois principales familles d'insecticides chimiques (organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides). Cette résistance est associée à la présence de plusieurs mécanismes, à la fois métabolique (estérases surproduites, mono-oxygénases) et par modification de la cible (*Ace.1^R*, *kdr*). En fonction de la distribution locale de ces mécanismes, il est possible d'envisager différentes stratégies de lutte pour le contrôle de cette espèce.

L'étude du polymorphisme des gènes neutres a montré qu'au sein d'une même ville les populations de *C. p. quinquefasciatus* ne sont pas différenciées et se comportent comme un vaste ensemble panmictique. Au contraire, à l'échelle des deux pays étudiés, les populations apparaissent fortement différenciées et ce d'autant plus que les villes sont géographiquement éloignées les unes des autres. Toutefois, l'isolement génétique de ces populations n'est que partiel et la mise en évidence de flux géniques plus ou moins importants permet d'expliquer la dispersion des gènes de résistance d'une ville à l'autre.

Dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest, nous avons mis en évidence une résistance aux pyréthrinoides d'*An. gambiae* s.s., vecteur majeur du paludisme. Cette résistance est associée à une mutation de la cible de ces insecticides (gène *kdr*). Nous avons évalué l'impact de cette mutation sur le comportement des moustiques en présence d'insecticides et tenté d'en prévoir les implications opérationnelles. Cette étude a montré que la résistance aux pyréthrinoides conférée par le gène *kdr*, ne devrait probablement pas constituer un obstacle majeur à la mise en place de programmes de lutte contre le paludisme basés sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides. Ces résultats ont été confirmés en terme de protection individuelle au niveau expérimental et sur le terrain.

Ces recherches doivent maintenant être poursuivies dans un cadre opérationnel. Elles devraient permettre de préciser les modes de circulation des gènes de résistance dans le but d'élaborer des stratégies adaptées pour lutter plus efficacement contre les moustiques, vecteurs de maladies tropicales. En ce sens, elles s'intègrent également bien dans le cadre des objectifs scientifiques qui sous-tendent à la création du futur Centre de Biologie et de Gestion des Populations.

Discipline: Interactions Hôtes-Parasites, Entomologie Médicale

Mots clés: *Anopheles gambiae* - *Culex pipiens quinquefasciatus* - insecticides - résistance - flux génique - lutte antivectorielle - paludisme - Afrique - Burkina Faso - Côte d'Ivoire.