



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Hétérogénéité génétique et résistance des vecteurs du paludisme (*Anopheles gambiae s.l.*) aux insecticides en zone cotonnière au Bénin

Rock AIKPON^{1*}, Antoine MISSIHOUN¹, Antoine LOKOSSOU², Gorgias AIKPON²,
Sahidou SALIFOU², Alexandre DANSI¹ et Clément AGBANGLA²

¹Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques, BP 2282 Goho, Bénin.

²Université d'Abomey-Calavi, BP 526 Cotonou, Bénin.

*Auteur correspondant ; E-mail : rockypremier@yahoo.fr

RESUME

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés dans la lutte anti vectorielle est un obstacle majeur pour les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. La présente étude avait pour but d'évaluer la diversité génétique des populations de *Anopheles gambiae* et la résistance aux insecticides (mutation *Kdr* et *Ace-1*) en zone cotonnière au Bénin. Deux méthodes de capture ont été utilisées pour la collecte d'échantillon. La capture sur appât humain et la récolte de la faune résiduelle matinale par spray. La PCR SINE a permis de distinguer deux espèces jumelles et d'obtenir les différents génotypes pour les deux gènes. Deux espèces du complexe *An. gambiae s.l.* ont été trouvées en sympatrie (*Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*). La résistance *kdr* et *Ace-1* connaissent un flux saisonnier. L'allèle résistant du gène *kdr* est fixé dans la population de vecteurs ($F_{is} > 0$). Par contre, un déficit de l'allèle résistant est noté au niveau du gène *Ace-1* ($F_{is} < 0$).

© 2020 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Hétérogénéité, génétique, résistance, vecteur, paludisme.

Genetic heterogeneity and resistance to insecticides in malaria vector *Anopheles gambiae s.l.* in the cotton growing area in Benin

ABSTRACT

Resistance of malaria vectors to insecticides used in vector control is a major threat for national malaria control programs. The purpose of this study was to assess the genetic diversity of *Anopheles gambiae* populations and resistance to insecticides (*Kdr* *Ace-1* mutation) in the cotton growing area in Benin. Two samples methods were used for mosquito collection: Human Landing catch (HLC) and the residual fauna collection by spray. The SINE PCR allow to identify species the different genotypes resistance genes. Two species of the *An. gambiae s.l.* complex have been found in sympatry (*Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*). *kdr* and *Ace-1* resistance had seasonal variation trend. The *kdr* resistance allele is fixed in the vector population ($F_{is} > 0$). Moreover, a deficit of the *Ace-1* resistance allele was observed ($F_{is} < 0$).

© 2020 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Heterogeneity, genetic, resistance, vector, malaria.

INTRODUCTION

La lutte acharnée contre le paludisme heurte à l'obstacle de la résistance des parasites aux médicaments antipaludéens (Plowe 2009) et des moustiques vecteurs aux insecticides (Ranson et al., 2011). *An. gambiae s.l.* constitue le vecteur principal du paludisme en Afrique au sud du Sahara (Taye et al., 2006). Parmi les différentes méthodes couramment utilisées pour contrôler cette maladie, les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MIILD) et la Pulvérisation Intra Domiciliaire (PID) d'insecticides à effet rémanent sont les plus utilisées (Beier et al., 2008; Kelly-Hope et al., 2008). L'utilisation abusive des mêmes classes d'insecticides en agriculture augmente le niveau de résistance (Hemingway et al., 2004). Cette augmentation de la résistance pourrait être liée à la sélection des allèles de résistance qui sont les plus avantageux dans le nouveau milieu créé par cette utilisation abusive de ces insecticides comme mentionné en Afrique de l'Ouest (Corbel et al., 2007; Darriet, 2017 ; Yadouléton et al., 2018).

De récentes études ont montré l'implication de deux gènes (*Kdr* et *Ace-1*) dans la résistance des moustiques vecteurs du paludisme à certaines classes d'insecticides comme les carbamates et les pyréthrinoïdes (Bimenya et al., 2010; Aikpon et al., 2013; Salako et al., 2018). Par ailleurs, des études conduites au Burkina-Faso (Diabate et al., 2002) et au Bénin (Yadouléton et al., 2010) ont montré que chez *An. gambiae s.l.* la fréquence de l'allèle de résistance (*1014F*) du gène *Kdr* est plus élevée dans les zones de culture habituellement soumises à des traitements insecticides qu'en zones rurales où les paysans ne pratiquent que les cultures vivrières ou des produits de consommation locale. Dans le contexte actuel où la résistance aux pyréthrinoïdes et aux cyclodiènes est très largement répandue en Afrique (Ranson et al., 2011; Ahadji-dabla et al., 2014), les études de la diversité des gènes de résistance aux insecticides des populations anophéliennes

sont d'une importance majeure pour améliorer les outils de lutte contre *An. gambiae*, vecteur majeur de plasmodies humaines.

La résistance d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes, seuls insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires est connue au Bénin et bien documentée (Aikpon et al., 2014 ; Ahadji-dabla et al., 2019) Il apparaît important, au regard de la dynamique qui caractérise les populations d'organismes vivants, de s'intéresser à l'évolution biologique dans le temps et dans l'espace des espèces vectrices comme *An. gambiae s.l.* afin de mieux gérer la résistance des vecteurs. C'est sur cette base que la présente étude se propose de suivre la dynamique des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* chez les vecteurs du paludisme (*Anopheles gambiae s.l.*) en zone cotonnière au Bénin. Elle permettra d'évaluer la diversité spécifique et génétique de la population anophélienne et d'évaluer leur niveau de résistance en zone cotonnière

MATERIEL ET METHODES

Zone d'étude

Cette étude a été réalisée de mars à août 2019 dans trois communes du département de l'Atacora (Natitingou, Toukountouna et Boukoubé) (Figure 1). Le département de l'Atacora est situé au nord-ouest du Bénin. Il compte neuf communes et couvre une superficie de 31665 km² caractérisé par un climat tropical dominé par deux saisons : une saison sèche (décembre – mai) et une saison pluvieuse (juillet – novembre) avec une pluviométrie annuelle moyenne comprise entre 1200 et 1350 mm. L'activité économique principale est l'agriculture dominée par la production du coton et du mil dont les rendements sont améliorés par l'usage des engrais chimiques et des pesticides. Dans le cadre de cette étude, deux localités ont été choisies par commune pour l'échantillonnage ; une localité urbaine et une autre périurbaine (Koussantigou et Perma) dans Natitingou, (Tchakalakou et Wabou) dans Toukountouna et (Koutagou et Tassayota) dans Boukoubé.

Méthodes expérimentales

Echantillonnage des moustiques vecteurs

Des captures de moustiques adultes ont été faites selon deux méthodes de capture: la capture sur appât humain (Figure 2a) et la récolte de la faune résiduelle par spray matinal dans les habitations humaines (Figure 2b). Le spray matinal consiste à pulvériser à l'aide d'une bombe aérosol les coins ou angles et cachettes des chambres tôt le matin avant l'ouverture des portes et fenêtres afin de recueillir les moustiques quinze minutes de temps après l'épandage sur des draps blancs étalés au sol (Djègbè et al., 2017). La capture sur appât humain, quant à elle, a été faite sur des volontaires munis de lampe torche et de tubes hémolyse. Ils capturent les moustiques se posant sur leurs jambes dénudées avant toute piqûre. Deux équipes de volontaires par commune sont formées grâce à cette technique de capture des moustiques. L'une des équipes est disposée à l'intérieur et l'autre à l'extérieur des ménages choisis.

Caractérisation morphologique du complexe *Anopheles gambiae s.l*

L'identification des espèces capturées dans la zone d'étude est la première étape. Elle consiste à l'identification morphologique à la loupe binoculaire à l'aide de clé de détermination établie par Gillies et Coetzee (1987).

Caractérisation moléculaire des populations *Anopheles gambiae s.l* capturées

La caractérisation moléculaire passe par les trois étapes suivantes:

Etape 1: Extraction d'ADN génomique du moustique au CTAB 2%

Les carcasses des moustiques (abdomen, ailes et pattes) ont été broyées dans 200 µl de CTAB à 2%. Après 5mn au bain-marie à 65 °C, le broyat a été mélangé avec 200 µl de chloroforme puis centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5 mn. Le surnageant a été délicatement récupéré dans un autre tube auquel on ajoute 200 µl d'isopropanol puis centrifugé à 12000 tours par minute pendant 15 minutes. La pelote d'ADN obtenue a été conservée avec 200 µl d'éthanol à 70%.

L'ensemble a été centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5 mn.

Le contenu du tube a été délicatement renversé afin de conserver la pelote d'ADN qui était ensuite séché pendant un moment sur la paillasse. Enfin 20 µl d'eau bi-distillée ont été ajoutés au pelote d'ADN pour la reconstituer.

Etape 2 : Amplification de l'ADN par PCR

L'identification des espèces se fait par la PCR diagnostic en se servant des amorces UN, AG, AA et AM. L'amorce UN est universelle et s'hybride avec une séquence nucléotidique particulière chez toutes les espèces de moustique. AG forme avec UN le couple d'amorces qui amplifie un fragment nucléotidique précis chez *Anopheles gambiae s.l* Il en est de même du couple d'amorces UN et AA qui amplifie un fragment nucléotidique particulier chez *Anopheles arabiensis*. Enfin, le couple d'amorces UN et AM réalise l'amplification nucléotidique d'un fragment uniquement chez *Anopheles melas*.

Pour différencier *Anopheles gambiae s.s.* et *Anopheles coluzzii* la PCR SINE selon le protocole de Santolamazza et al., (2008) est faite avec les couples d'amorces F6 et R6.

Le Tableau 1 présente les séquences nucléotidiques de ces amorces.

Après amplification de l'ADN les tailles attendues sont : *An. coluzzii*: 479 pb ; *An. gambiae s.s.*: 249 pb ; *An. arabiensis*: 223 pb.

Pour déterminer la mutation *L1014F* du gène *Kdr* chez les différentes espèces, la PCR selon le protocole de Martinez-Torres et al., (1998) est faite avec les amorces AgD1, AgD2, AgD3 et AgD4. Le couple d'amorces AgD1/AgD2 flanque le gène de mutation *Kdr*, en amplifiant un produit de 293pb comme contrôle. Le couple d'amorce AgD3/AgD1 s'apparie seulement avec la portion résistante du gène *Kdr* pour amplifier un fragment de 195 pb. Le couple AgD4/AgD2 s'associe uniquement avec la portion du gène sensible en amplifiant un fragment de 137pb. Enfin l'identification de la présence de la mutation *G119S* se fait grâce aux amorces (Tableau 2) selon le protocole de Weill et al., (2004).

Etape 3 : Migration de l'amplification

Les produits d'amplification obtenus ont été migrés sur gel d'agarose 2%. A la fin de la migration, la visualisation de la taille des fragments d'ADN a été faite à l'ultra-violet en comparant les différentes bandes obtenues au marqueur de poids moléculaire 100pb.

Analyses statistiques

Pour mieux interpréter les résultats, l'ensemble des individus d'une même espèce capturés dans le département de l'Atacora est considéré comme la population d'espèce tandis que celui des individus d'une même espèce capturée par commune est considéré comme sous-population. Plusieurs approches analytiques ont été utilisées pour analyser les données de cette étude. Le logiciel Genepop version 4.2 a été utilisé pour calculer les fréquences alléliques des deux gènes. La p-value associée à chaque fréquence du gène a été calculée avec la fonction de test binomial du logiciel R version 3.3.3. L'équilibre de Hardy-Weinberg a aussi été testé (HWE) pour

vérifier s'il y avait panmixie dans les populations d'anophèles des zones d'étude.

Le logiciel Genepop version 4.2 a également permis de calculer certains indices de diversité génétique comme l'hétérozygotie observée (H_o), hétérozygotie attendue (H_e), indice de fixation (F_{IS}) et la différenciation génétique au sein des populations (F_{ST}) pour identifier les causes probables d'un éventuel écart par rapport à la panmixie à l'aide de (Weir et Cockerham 1984). L'indice de fixation (F_{IS}) permet de quantifier la différence par rapport à la panmixie. Si $F_{IS} < 0$, la population exprime un excès d'hétérozygotes, mais si $F_{IS} > 0$, il présente un déficit en hétérozygotes. Les critères utilisés pour évaluer la différenciation génétique au sein des populations sont ceux définis par Hartl. La différenciation génétique est faible si la valeur F_{ST} est inférieure ou égale à 0,05, modérée quand sa valeur est comprise entre [0,05; 0,15] et importante quand il est compris entre [0,15; 0,25]. Cette différenciation est très importante si la valeur F_{ST} est supérieure à 0,25.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour identifier les espèces du complexe *Anopheles gambiae*.

Séquence nucléotidique des amorces du PCR diagnostic	Séquence nucléotidique des amorces du PCR diagnostic SINE (Santolamazza et al. 2008)
UN 5'-GTGTGCCGCTTCTCTCGATGT-3'	F6 : TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA
AG 5'-CTGGTTTGGTTCGGCACGTTT-3'	
AA 5'-AAGTGCCTTCTCCATCCTA-3'	R6 : CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC
AM 5'-GTGACCAACCACTCCCTTGA3'	

PCR : Polymerase Chain Reaction ; SINE : short Interspersed Elements.

Tableau 2 : Séquences nucléotidiques des amorces d'identification des allèles mutés.

Les séquences nucléotidiques des amorces pour la mutation <i>Kdr</i> (Martinez-Torres et al. 1998)	Les séquences nucléotidiques des amorces pour la mutation <i>Ace-I</i> (Weill et al. 2004).
Agd1 :5'-ATAGATTCCCCGACCATG-3'	Ex3AGdir : 5'-GATCGTGGACACCGTGTTTCG-3'
Agd2 : 5'-ACAAGGATGATGAACC-3'	
Agd3: 5'-AATTTGCATTACTTACGACA-3'	Ex3AGrev:5'-AGGAT GGCCCCGCTGGAACAG-3'
Agd4:5'-CTGTAGTGATAGGAAATTTA-3'	

Kdr : knockdown resistance ; Ace : Acetylcholinesterase.

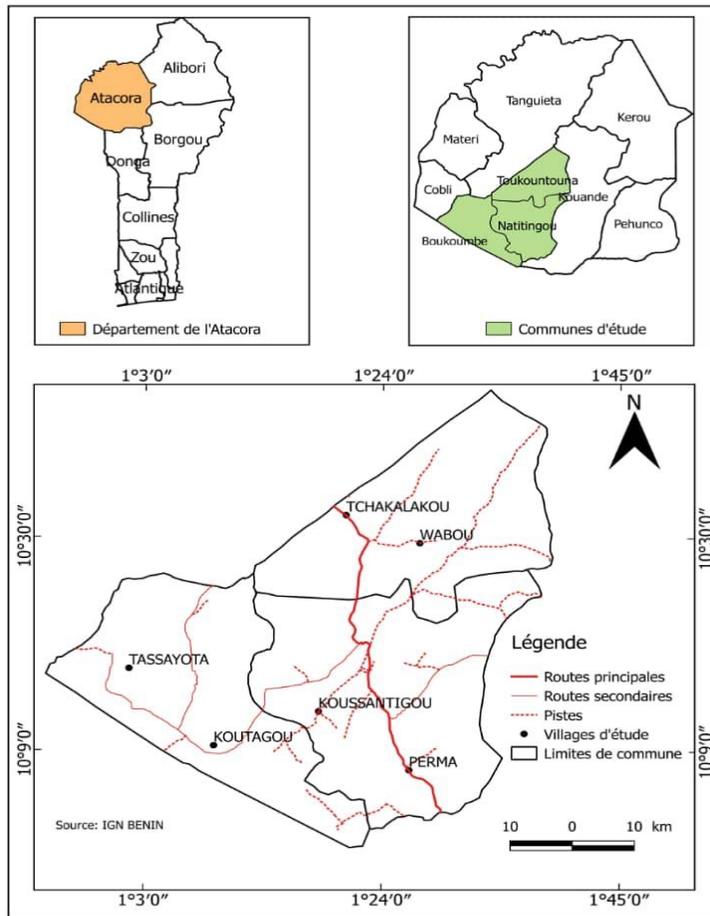


Figure 1: Carte de la zone d'étude.



Figure 2a : Capture sur appât humain.



Figure 2b : Récolte de moustique après spray matinal.

RESULTATS

Répartition saisonnière des espèces d'*Anopheles gambiae s.l.* dans la région de l'Atacora

Après les différentes captures effectuées, 1720 *Anopheles gambiae s.l.* ont été capturés dans l'ensemble des trois communes dont 896 anophèles en saison sèche et 824 anophèles en saison pluvieuse. Deux espèces jumelles du complexe *Anopheles gambiae s.l.* ont été retrouvées en sympatrie : *Anopheles gambiae s.s.* et *Anopheles coluzzii*. Le Tableau 3 montre la répartition spatiale des deux espèces en fonction des saisons avec 688 *Anopheles gambiae s.s.* contre 136 *Anopheles coluzzii* en saison pluvieuse et 516 *Anopheles gambiae s.s.* contre 380 *Anopheles coluzzii* en saison sèche (Tableau 3).

Variation saisonnière des fréquences alléliques du gène *Ace-1* dans le département de l'Atacora

Le Tableau 4 présente les variations saisonnières de la fréquence allélique du gène *Ace-1* dans les différentes communes d'étude. A Natitingou, elles sont de 12,00% en saison pluvieuse contre 4,20% en saison sèche ; 7,10% contre 0,90% à Toukountouna et 12,20% contre 0,60 à Boukoumbé. Globalement la *f* (*Ace-1*) est de 10,10% et 1,80% respectivement pendant la saison pluvieuse et saison sèche. Ces fréquences alléliques présentent une variation significative quelle que soit la saison (p -value < 0.001).

Variation saisonnière des fréquences alléliques du gène *Kdr* dans le département de l'Atacora

Le Tableau 5 présente les variations saisonnières des fréquences alléliques du gène *Kdr* dans les localités du département de l'Atacora. *f* (*kdr*) est de 88,00% en saison pluvieuse contre 75,90% en saison sèche à Natitingou ; 83,90% contre 80,80% à

Toukountouna et 91,30% contre 98,03% à Boukoumbé. Ainsi, pour l'ensemble des trois localités de l'Atacora la *f* (*kdr*) est de 87,30% en saison pluvieuse contre 82,60% en saison sèche. Par ailleurs, les fréquences alléliques du gène *Kdr* présentent une variation allélique significative quelle que soit la saison (p -value < 0,001).

Etude saisonnière de la panmixie

Le Tableau 6 présente l'hétérozygotie observée (H_o), l'hétérozygotie attendue (H_e) et l'indice de fixation (F_{IS}) chez *Anopheles gambiae s.s.* pour les deux loci dans les différentes localités d'étude. Pour les allèles *G119S* et *L1014F*, l'hétérozygotie observée était relativement plus faible que celle attendue pendant la saison pluvieuse dans les localités d'étude. Ce même constat est fait pendant la saison sèche pour *L1014F* tandis que l'hétérozygotie observée était relativement égale à celle attendue pour *G119S*. L'indice de fixation F_{IS} varie d'une saison à une autre. Ainsi, il est plus relativement élevé en période pluvieuse qu'en période sèche pour *G119S* dans les différentes localités tandis qu'il est faible en période pluvieuse qu'en période sèche pour *L1014F*. La p -value à l'équilibre de Hardy-Weinberg permet de constater que pour *G119S*, toutes les sous-populations (localités) d'*An. gambiae s.s.* n'exprimaient un écart à la panmixie (p -value > 0,05) quelle que soit la saison sauf celle de Natitingou en saison pluvieuse. Elle permet, par contre, de constater que pour *L1014F*, toutes les sous-populations (localités) d'*An. gambiae s.s.* exprimaient un écart à la panmixie (p -value < 0,05) quelle que soit la saison sauf celle de Natitingou en saison pluvieuse.

Les sous-populations d'*An. gambiae s.s.* présentaient un déficit d'hétérozygotie quelle que soit l'allèle en saison pluvieuse. Cependant, en saison sèche, nous avons noté un excès en hétérozygotie dans l'ensemble des

sous-populations pour *G119S* tandis qu'un déficit en hétérozygotie est observé dans l'ensemble des sous-populations pour *L1014F*.

Différenciation génétique

Le Tableau 7 présente la différenciation génétique moyenne de la population d'*Anopheles gambiae s.s.* dans le département de l'Atacora. Une faible différenciation

génétique est observée au sein de la population d'*Anopheles gambiae s.s.* quel que soit l'allèle. Les indices F_{ST} liés à la mutation *L1014F* du gène *Kdr* sont 0,013 et 0,006 respectivement pour les saisons pluvieuse et sèche. Ceux liés à la mutation *G119S* du gène *Ace-1* sont 0.008 et 0.020 respectivement pour les saisons pluvieuse et sèche.

Tableau 3: Répartition saisonnière d'*An. gambiae s.s.* dans le département de l'Atacora.

	Localités	saison de collecte des moustiques	Effectif	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>
	Natitingou	Saison pluvieuse	263	212	51
		Saison sèche	324	168	156
Département de l'Atacora	Toukountouna	Saison pluvieuse	327	280	47
		Saison sèche	237	112	125
	Boukoubé	Saison pluvieuse	234	196	38
		Saison sèche	335	236	99
Total		Saison pluvieuse	824	688	136
		Saison sèche	896	516	380

Tableau 4: Distribution des fréquences alléliques de la mutation *G119S* du gène *Ace-1* chez *Anopheles gambiae s.s.* en fonction des saisons.

Localités	Saisons	Nombre testé	Effectif			Fréquence%	p-value
			<i>119S/119S</i>	<i>119G/119S</i>	<i>119G/119G</i>	F(<i>G119S</i>)	
Natitingou	Saison pluvieuse	212	8	35	169	12,0	< 0,001
	Saison sèche	168	0	14	154	4,2	< 0,001
Toukountouna	Saison pluvieuse	280	2	36	242	7,1	< 0,001
	Saison sèche	112	0	2	110	0,9	< 0,001
Boukoubé	Saison pluvieuse	196	4	40	152	12,2	< 0,001
	Saison sèche	236	0	3	233	0,6	< 0,001
Total=Atacora	Saison pluvieuse	688	14	111	563	10,1	< 0,001
	Saison sèche	516	0	19	497	1,8	< 0,001

Tableau 5: Distribution des fréquences alléliques de la mutation *L1014F* du gène *Kdr* chez *Anopheles gambiae s.s.*

Localités	Saisons	Nombre testé	Effectif			Fréquence % F(L1014F)	p-value
			1014F/1014F	1014L/1014F	1014L/1014L		
Natitingou	Saison pluvieuse	212	167	39	6	88,00	< 0,001
	Saison sèche	168	111	33	24	75,90	< 0,001
Toukountouna	Saison pluvieuse	280	203	64	13	83,90	< 0,001
	Saison sèche	112	79	23	10	80,80	< 0,001
Boucoubé	Saison pluvieuse	196	166	26	4	91,30	< 0,001
	Saison sèche	236	189	39	8	88,30	< 0,001
Total=Atacora	Saison pluvieuse	688	536	129	23	87,30	< 0,001
	Saison sèche	516	379	95	42	82,60	< 0,001

Tableau 6: Variation saisonnière des hétérozygoties observées et attendues, de l'indice de fixation et de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

	<i>G119S</i>				<i>L1014F</i>			
	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{IS}</i> (W&C)	<i>p-value HWE</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{IS}</i> (W&C)	<i>p-value HWE</i>
	SP(SS)	SP(SS)	SP(SS)	SP(SS)	SP(SS)	SP(SS)	SP(SS)	SP(SS)
Natitingou	0.1651(0,0833)	0.2121(0,0801)	0,2221 (-0,4050)	0,0043(1,000)	0.1840(0,0000)	0.2121(0,2456)	0,1331(1,000)	0,0960(0,000)
Toukountouna	0.1286(0,0179)	0.1329(0,0178)	0,0326 (-0,0045)	0,6369(1,000)	0.2143(0,2054)	0.2799(0,3116)	0,2346(0,3420)	0,0004(0,0009)
Boucoubé	0.2041(0,0127)	0.2155(0,0126)	0,0529 (-0,0043)	0,5020(1,000)	0.1326(0,1652)	0.1588(0,2063)	0,1652(0,1994)	0,0430(0,0060)

F_{IS} : indice de fixation ; *W&C* : Weir & Cockerham ; *H_o* : hétérozygotie observée ; *H_e* : hétérozygotie attendue ; *HWE* : Equilibre de Hardy weinberg ; *SP* : saison pluvieuse ; *SS* : saison sèche.

Tableau 7: Différenciation génétiques des différentes populations *Anopheles gambiae s.s.*

	<i>F_{ST}</i> (W&C) <i>L1014F</i>	<i>F_{ST}</i> (W&C) <i>G119S</i>
	<i>SP(SS)</i>	<i>SP(SS)</i>
Atacora	0,013(0.006)	0,008(0.020)

SP : saison pluvieuse ; *SS* : saison sèche.

DISCUSSION

Les résultats de cette étude ont montré une répartition hétérogène des espèces *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii* dans les différentes localités d'études selon la saison. Ces différentes espèces se retrouvent en sympatrie dans les localités. Quelle que soit la saison, *An. gambiae s.s.* reste l'espèce majoritaire. Toutefois *An. coluzzii* est plus représenté en saison sèche. Ceci serait probablement dû à la nature (permanente ou temporaire) des gîtes ayant favorisé l'émergence de ces moustiques et la période de capture. La représentativité relative d'*An. coluzzii* en saison sèche peut aussi s'expliquer par la réduction du nombre de gîtes temporaires au profit de ceux permanents. Cette observation confirme les travaux de Aïkpon et al. (2013) qui ont constaté l'abondance de *An. coluzzii* en période sèche. Selon Mbida et al. (2016) au Cameroun, *An. coluzzii* est associé aux gîtes permanents et ceux résultant de l'activité humaine alors que *An. gambiae* est plus inféodé aux gîtes temporaires et dépendants des pluies. Ces mêmes auteurs ont conclu que *An. coluzzii* préfère les collections d'eaux urbaines et s'adapte vite à la pollution. De même, la distribution saisonnière variée de ces deux espèces confirme les résultats antérieurs au Bénin qui rapportaient que les formes moléculaires M et S vivaient en sympatrie, avec la prédominance des formes S dans les zones de savane (Djogbénou et al., 2010). En outre, les allèles de résistance 119S et 1014F respectivement des gènes *Ace-1* et *Kdr* dans la région de l'Atacora ont été retrouvés, présentant une fréquence allélique plus élevée en saison pluvieuse qu'en saison sèche avec une différence significative (p -value < 0.05). Ce résultat peut s'expliquer par l'utilisation intensive d'insecticide (notamment les carbamates et pyréthrinoides) en saison des pluies pour la production agricole et accentué par l'implémentation de la pulvérisation intra domiciliaire (PID) dans l'Atacora depuis une

dizaine d'année. L'utilisation massive d'insecticide constitue donc une pression de sélection de ces allèles de résistance chez les vecteurs du paludisme en Afrique. La preuve d'une relation entre l'utilisation des insecticides en agriculture et l'émergence de résistance chez les vecteurs du paludisme a été rapportée par plusieurs auteurs dont Yadouleton et al. (2010). En examinant l'impact de l'agriculture sur la résistance des vecteurs, Pierrat (2012) a noté au moins 15 espèces de vecteurs du paludisme pour lesquelles la résistance était directement liée aux traitements agricoles. Tout ceci confirme l'idée selon laquelle la résistance aux pyréthrinoides chez *An. gambiae s.s.* en Afrique de l'Ouest trouve sa cause dans les traitements agricoles inadéquats, en particulier ceux appliqués au coton. Par ailleurs, il a été observé aussi que la fréquence allélique de *L1014F* est plus élevée dans l'Atacora que celle de *G119S* quelle que soit la saison.

L'augmentation de la fréquence de l'allèle résistant du gène *Ace-1* en saison pluvieuse pourrait être imputable au coût génétique lié à ce gène (Djogbénou et al., 2010).

Cette remarque dans l'Atacora est similaire à celles rapportées par Yadouleton et al., (2011) dans trois autres communes au nord-est du Bénin (Parakou, à Kandi et à Banikoara) avec une prédominance remarquable du génotype homozygote résistant *1014F/1014F*. L'augmentation de la fréquence allélique de la mutation *L1014F* du gène *Kdr* chez les populations d'*An. gambiae s.s.* est inquiétante étant donné que ce gène associé à des mécanismes physiologiques de résistance, pourrait avoir un impact significatif sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action distribuées et utilisées dans tout le pays pour la lutte contre le paludisme.

En effet, l'hétérozygotie observée est inférieure à l'hétérozygotie attendue ($H_o < H_e$) par endroit pour les deux gènes, cela signifie qu'il y a plus d'homozygotes que prévus dans

les populations étudiées. Cet excès d'homozygotes est assimilé à un risque de consanguinité au sein des sous-populations de l'Atacora. Par opposition, pour *G119S*, il n'a pas été noté une grande différence entre les valeurs des hétérozygoties observées et attendues chez les trois sous-populations pendant la saison sèche. Elles n'expriment donc pas un écart à la panmixie. C'est-à-dire que ces sous-populations sont en équilibre de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$) pendant la saison sèche. L'équilibre observé dans ces zones peut être lié aux effectifs échantillonnés ayant servi à l'analyse des données ou à une migration ponctuelle des individus favorisant les flux génétiques et des croisements aléatoires entre les individus. En outre, les valeurs de F_{IS} supérieures à zéro et importantes dans certaines zones, expriment aussi un déficit global en hétérozygotes dans les populations des localités échantillonnées. Il suggère une forte influence de la consanguinité au sein de ces sous-populations. Ce phénomène pourrait être aussi lié à la sélection généralisée de ce locus chez les différentes espèces (Gnanguenon et al., 2015) par l'action des insecticides (pyréthrinoides, carbamates et organophosphorés) sur les moustiques. Les individus sensibles seront éliminés au profit des résistants qui, par des accouplements préférentiels liés à l'effectif limité de leur population, vont transmettre presque exclusivement l'allèle de résistance à leurs descendants. Ils assurent de ce fait l'expansion de cette mutation génétique au sein des populations. Mis à part le hasard, trois principaux facteurs pourraient expliquer ce déséquilibre observé. Il s'agit de facteurs génétiques, l'existence d'allèles nuls et l'effet Wahlund. En ce qui concerne les causes génétiques, il est bien connu que la consanguinité (accouplement entre un individu et ses ascendants, ses collatéraux et/ou ses descendants) modifie les fréquences génotypiques. La conséquence en est une perte

de variabilité génétique au cours des générations. Le second facteur pourrait être inhérent à l'existence d'allèles nuls allèles ne donnant lieu par PCR à aucune amplification. Une délétion au niveau des amorces ou une mutation dans les séquences flanquantes du gène pourraient entraîner la présence d'allèles nuls. Enfin, le dernier facteur fait référence à la présence de sous-populations à l'intérieur de chaque population (zones agro-écologiques) pouvant induire l'effet Wahlund.

D'autre part, les valeurs des indices de différenciation obtenues dans cette étude expriment clairement une faible différenciation génétique au sein de la population d'*An. gambiae s.s.* de l'Atacora pour ces loci *L1014F* et *G119S*. Nous pouvons donc dire de ces résultats, qu'il n'y a pas de différence entre ces sous populations vectrices (*An. gambiae s.s.*) des localités étudiées, lesquels résultats ne sont pas loin de ceux obtenus par Fassinou et al. (2019). Ils révèlent, par conséquent, de nombreux flux de gènes entre les sous populations d'*An. gambiae s.s.* des trois localités nonobstant la saison. Ceci grâce à l'absence probable de barrières écologiques entre ces sous populations (localités) dans la zone d'étude. Cependant, les flux de gènes ne sont pas égaux entre chaque zone, et certaines d'entre elles sont un peu plus isolées que d'autres. Aussi le type de marqueur qui a servi d'étude et la taille des échantillons peuvent aussi influencer la faible différenciation obtenue.

Conclusion

La présente étude a permis d'avoir une idée de la distribution saisonnière des espèces de *An. gambiae s.s.* et *An. Coluzzii* mais également de variabilité des fréquences alléliques des gènes de résistance *Ace-1* et *Kdr* au sein des populations de vecteurs étudiés. Ces travaux montrent que l'allèle résistant *L1014F* du gène *Kdr* a été fortement sélectionné dans toutes les zones d'étude pour

An. gambiae s.s. Par ailleurs, un déficit d'hétérozygotie est observé avec une faible différenciation génétique au sein de la population d'*Anopheles gambiae s.s.* de l'Atacora par rapport aux allèles de résistances quelle que soit la saison. Il est souhaitable de poursuivre les études sur la diversité génétique des vecteurs du paludisme en utilisant des marqueurs moléculaires plus résolus pour mieux établir la fine structure génétique de ces populations.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

RA, AM, AL, GA, SS, AD et CA ont rédigé le protocole de l'étude. RA est l'instigateur principal de l'étude et a rédigé l'article. RA et AL ont fait la collecte et l'analyse des données. Tous les auteurs ont approuvé le manuscrit final.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou qui a abrité les travaux de laboratoire. Nous remercions également l'Ecole Supérieure de Natitingou qui a soutenu matériellement et moralement ce travail.

REFERENCES

Ahadji-dabla KM, Ketoh GK, Nyamador WS, Apétogbo GY, Glitho IA. 2014. Susceptibility to DDT and pyrethroids, and detection of knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* sensu lato in Southern Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(1): 314-323. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i1.27>

Ahadji-dabla KM, Ngoagouni C, Dery BD, Apétogbo GY, Ketoh GK, Glitho IA. 2019. Spatio-seasonal distribution of *Anopheles gambiae* sensu lato and

dynamics of the Voltage gate sodium channel knock down resistance mutation (*Vgsc-1014F*) in the city of Lomé, Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **13**(3): 1654-1668. DOI :

<https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v13i3.36>

Aïkpon R, Ago F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, Oké-Agbo F, Akogbéto M. 2013. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasites & Vectors*, **6**: 192. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-192>

Aïkpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, Oussou O, Oké-Agbo F, Beach R, Akogbéto M. 2014. Good Performances but Short Lasting Efficacy of Actellic 50 EC Indoor Residual Spraying (IRS) on Malaria Transmission in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors*, **7**: 256. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-256>

Bimenya GS, Mugisha PS, Okwi AL, Habarulema M, Lugemwa M. 2010. Does resistance of *Anopheles* mosquitoes to knock-out effect of DDT deter the ability of the chemical to control malaria in Uganda. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **4**(3): 657-668. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v4i3.60481>

Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougaard JM, Rowland M. 2007. « Multiple Insecticide Resistance Mechanisms in *Anopheles Gambiae* and *Culex Quinqefasciatus* from Benin, West Africa ». *J. Acta Tropica.*, **101**(3): 207-216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.01.005>

Darriet F. 2017. Bibliographie : *Moustiquaires Imprégnées et Résistance des Moustiques aux Insecticides*. IRD Éditions : Marseille. DOI:

- <http://books.openedition.org/irdeditions/9965>
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C. 2002. The Role of Agricultural Use of Insecticides in Resistance to Pyrethroids in *Anopheles Gambiae* s.l. in Burkina Faso. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**(6): 617-22. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.617>
- Djègbè I, Missihoun AA, Djouaka R, Akogbeto M. 2017 Surveillance Entomologique: Dynamique de la population et de la résistance aux insecticides chez *Anopheles gambiae* s.l.; en milieu de riziculture irriguée au Sud Bénin. *Journal of Applied Biosciences*, **111**: 10934-10943
- Djogbénu L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, Weill M, Chandre.F.2010. Malaria Vectors in the Republic of Benin: Distribution of Species and Molecular Forms of the *Anopheles Gambiae* Complex. *J. Acta Tropica*, **114**(2): 116-122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.001>
- Fassinou AJ, Koukpo CZ, Ossè R, Agossa F, Assogba B, Sidick A, Sèwadé W, Akogbéto M, Sèzonlin M. 2019. Genetic structure of *Anopheles gambiae* s.s populations following the use of insecticides on several consecutive years in southern Benin. *Tropical Medicine and Health*, **47**(1): 23. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41182-019-0151-z>.
- Gillies, Coetzee M. 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.*, **55**: 1-143.
- Gnanguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, Azondekon R. 2015. Malaria Vectors Resistance to Insecticides in Benin: Current Trends and Mechanisms Involved. *Parasites & Vectors*, **8**: 223. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0833-2>
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(7): 653-665. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Kelly-Hope L, Ranson H, Hemingway j. 2008. Lessons from the Past: Managing Insecticide Resistance in Malaria Control and Eradication Programmes. *The Lancet Infectious Diseases*, **8**(6): 387-389. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70045-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70045-8)
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. 1998. Molecular Characterization of Pyrethroid Knockdown Resistance (*Kdr*) in the Major Malaria Vector *Anopheles Gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, **7**(2): 179-84.
- Mbida-Mbida J, Etang J, Ntonga P, Moukoko E, Awono-Ambene A, Abdou T. 2017. Nouvel aperçu sur l'écologie larvaire d'*Anopheles coluzzii* dans l'estuaire du Wouri, Littoral-Cameroun. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, **110**: 92-101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13149-016-0519-9>
- Pierrat C. 2012. Risque palustre : appréhender la vulnérabilité des individus à l'échelle locale (Sud du Bénin). *VertigO - La Revue Electronique en Sciences de l'Environnement*, **11**: 3. DOI: <http://journals.openedition.org/vertigo/11549>

- Plowe CV. 2009. The Evolution of Drug-Resistant Malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**(1): S11-S14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.11.002>
- Ranson H, N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. 2011. Pyrethroid Resistance in African Anopheline Mosquitoes: What Are the Implications for Malaria Control? *Trends in Parasitology*, **27**(2): 91-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004>
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Torre A. 2008. Insertion Polymorphisms of SINE200 Retrotransposons within Speciation Islands of *Anopheles Gambiae* Molecular Forms. *Malaria Journal*, **7**: 163. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-163>
- Taye A, Hadis M, Adugna N, Tilahun D, Wirtz RA. 2006. « Biting behavior and Plasmodium infection rates of *Anopheles arabiensis* from Sille, Ethiopia ». *J. Acta Tropica*, **97**(1): 50-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.08.002>
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. 2004. The unique mutation in Ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, **13**: 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x>
- Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbénou L, Dabiré R. 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasites & Vectors*, **4**: 60.
- Yadouleton A, N'Guessan R, Allagbé H, Asidi A, Boko M, Osse R, Padonou G, Kindé G, Akogbéto M. 2010. The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin. *Parasites & Vectors*, **3**(1): 118. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-118>
- Yadouleton A, Klotoe JR, Agbanrin R, Ahissou F, Houndeton G, Tossou R, Agolinou A, Akogbeto M. 2018. Contrôle de qualité des rideaux imprégnés à la bifenthrine en vue de leur utilisation et vulgarisation au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **12**(5): 2044-2052. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v12i5.7>