

**Influence de quelques paramètres biotiques et
abiotiques sur la ségrégation entre les espèces du
complexe *Anopheles gambiae***

Remerciements

Je rends grâce à Allah le Tout Puissant et Miséricordieux.

Le travail présenté dans ce document a été mené au pôle de Zoologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar, en collaboration avec le département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD. Il a été encadré et suivi par le **Dr Ibrahima Dia**. L'aboutissement de ce travail a été possible grâce à des personnes que je ne saurais suffisamment remercier :

- **Dr Amadou Alpha Sall**, Administrateur Général de l'Institut Pasteur de Dakar pour m'avoir accepté dans sa structure mais aussi pour m'avoir permis de mettre en pratique mes connaissances théoriques.

- **Dr Mawlouth Diallo** pour m'avoir accueillie dans son unité de recherche. Son ouverture d'esprit et sa rigueur scientifique font de lui une référence incontournable. Son souci du travail fait de lui un dirigeant exemplaire.

- **Dr Ibrahima Dia** qui m'a guidé à chaque étape de cette étude, m'a permis de bénéficier de son encadrement. Les conseils qu'il m'a prodigués, la patience et la confiance qu'il a témoignée ont été déterminantes dans la réalisation de mes travaux. Le mérite de ce document vous revient. Je ne saurais vous remercier assez, de m'avoir guidé vers le monde de la recherche. A vos côtés j'ai appris le dynamisme et la rigueur scientifique, vos qualités humaines et professionnelles nous inspirent à nous surpasser. Veuillez trouver ici, l'expression de mes plus sincères remerciements.

- **Dr Elhadj Malick Ngom** que je remercie pour la collecte des données sur le terrain, d'avoir supervisé mon travail au laboratoire. Sa disponibilité a été sans faille. Ses bonnes explications nous ont éclairé le chemin de la recherche et sa collaboration dans l'accomplissement de ce modeste travail nous a été d'un très grand apport. Je vous exprime toute ma gratitude.

- **Dr Diawo Diallo** que je remercie pour sa sympathie, sa courtoisie et sa modestie, toujours disponible et à l'écoute. Mais aussi pour avoir accepté de juger ce travail. C'est un honneur d'avoir débuté la recherche à vos côtés.

- **Dr Yamar Ba** pour ses connaissances scientifiques, sa modeste personne. Son sens de l'humour fait de lui une personne spéciale.

- **Dr Toffène Diome** responsable du laboratoire d'Entomologie FST/UCAD que je remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

- **Pr Ousmane Faye** responsable du laboratoire LEVP/FST/UCAD que je remercie d'avoir consacré du temps à mon travail, mais aussi de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury malgré ses multiples occupations.

- Je ne saurais terminer sans remercier mes collègues Dr El hadj Ndiaye, Dr Déthié Ngom, Assiyatou Guèye, Marième Guèye, Babacar Diouf, Dr Alioune Gaye, Dr Cheikh Lô, Penda Sabaly, Aliou Khoulé, Dr Faty A. Sy, Ndèye M. Sène, Mamadou L. Dione, Baye B. Ndoeye, Aminata Badji, Adama Sognane et Mouhamed Faye

Dédicaces

Je dédie ce travail :

- A mon père

Pour sa présence, son soutien, sa détermination et son engagement. C'est grâce à toi, Papa, que j'ai fait mes études sans contrainte. Tu as été toujours présent et prêt à faire le nécessaire pour la réussite de tes enfants. Qu'Allah te donne une bonne santé et une longue vie. La réussite est au bout du tunnel.

- A ma mère

Pour sa présence, son soutien et ses efforts inlassables pour nous donner une bonne éducation. Qu'Allah te donne une bonne santé et une longue vie.

- Mes sœurs

Maguette, Ndèye Maguette, Aicha, Fatima, Mariama et Thiam. Vous avez été toujours présentes et disponibles. Ce travail est le vôtre. C'est grâce à vous que j'ai toujours été bien encadrée.

- Mes frères

Mohamed, Macheikh, Aliou, Diadji et Djiby. Votre sérieux et votre sens des responsabilités ont toujours été exemplaires.

- A tous mes oncles, qui n'ont jamais cessé de me conseiller

- Monsieur Goudiaby, mon Professeur de SVT au lycée zone de recasement de Keur Massar. Vous avez fortement participé à l'éveil de mon amour pour la biologie et l'analyse scientifique.

- Monsieur Ndiaye, enseignant à l'école élémentaire Unité 5, qui m'a appris à prôner l'excellence et à avoir un esprit critique.

- A tous les étudiants de la 11^e promotion du master de Biologie Animale, pour les belles années passées ensemble, la solidarité et le partage.

- A l'ensemble du personnel du pôle de Zoologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar, pour tous bons moments passés ensemble et les connaissances et expériences partagées.

Liste des abréviations et acronymes

ADN : Acide désoxyribonucléique
AG : *Anopheles gambiae*
An : *Anopheles*
AR : *Anopheles arabiensis*
AV : Avec végétation
CTAB : Cétyle triméthyl ammonium Bromide
ddl : degré de liberté
dNTP : Désoxyribonucléoside Triphosphate
E : Ensoleillé
Kdr : Knock down resistance
ML : *Anopheles melas*
min : minute
NE : non ensoleillé
NP : non présent
NT : non turbide
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P : Présent
Pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
r : coefficient de corrélation
s : seconde
sensu lato : sens large
s.s. : sensu stricto
SV : Sans végétation
T : Turbide
Taq : *Thermus aquaticus*
UN : Universel
 χ^2 : Chi2
° : degré
H : Heure

Table des matières

Remerciements	i
Dédicaces	ii
Liste des abréviations	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	v
Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
1. Généralités sur les vecteurs du paludisme	3
1.1. Systématique	3
1.2. Cycle de développement	4
1.2.1. Phase aquatique	4
1.2.2. Phase aérienne	5
2. Le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	6
2.1. Composition	6
2.2. Distribution	6
2.3. Caractéristiques bioécologiques	8
3. Les vecteurs du paludisme au Sénégal	8
Chapitre II : Matériels et méthodes	10
1. Site d'étude	10
2. Échantillonnage des stades aquatiques et recueil des paramètres physico-chimiques et biologiques	11
3. Traitement au laboratoire	11
3.1. Extraction d'ADN	11
3.2. Identification des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> par PCR	11
4. Analyse des résultats	12
Chapitre III : Résultats et discussion	14
1. Résultats	14
1.1. Typologie, abondance et positivité des gîtes prospectés	14
1.2. Identification des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> par PCR	15
1.3. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction des types de gîte	16
N : nombre, % : pourcentage	16
1.4. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction de la nature du gîte	17
1.5. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction de la taille des gîtes	17
1.6. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction de la turbidité, de l'ensoleillement, de la présence de culicidés et de la végétation	18
1.7. Influence du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la salinité	19
2. Discussion	21
3. Conclusion	23
Références bibliographiques	24
Annexe	30

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de développement des moustiques du genre <i>Anopheles</i> (Carnevale & Robert, 2009).....	5
Figure 2 : Présentation schématique du complexe <i>Anopheles gambiae</i> (Carnevale & Robert, 2009).....	6
Figure 3 : Répartition des espèces du complexe <i>gambiae</i> en Afrique (d'après Lanzaro & Lee, 2013). A: <i>An. arabiensis</i> (rouge); B: <i>An. gambiae</i> s.s. (vert); C: <i>An. melas</i> (bleu), <i>An. merus</i> (orange) et <i>An. bwambae</i> (cyan); D: <i>An. quadriannulatus</i> (ancienne espèce A) (jaune), <i>An. amharicus</i> (ancienne espèce <i>An. quadriannulatus</i> B) (magenta) et <i>An. comorensis</i> (cyan encerclé)	7
Figure 4 : Localisation de la zone d'étude.....	10
Figure 5 : Photo d'un gel d'agarose après migration. MT : marqueur de taille, AR : <i>An. arabiensis</i> , GB : <i>An. gambiae</i>	12
Figure 6 : Types de gîtes investigués dans la zone de Toubacouta en octobre 2020	14
Figure 7 : Typologie et positivité des gîtes étudiés.....	15
Figure 8 : Variations des fréquences des espèces en fonction de la nature des gîtes	17
Figure 9 : Variations des fréquences des espèces en fonction de la taille des gîtes	18
Figure 10 : Variation des fréquences d' <i>An. gambiae</i> en fonction du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la température	20
Figure 11 : Variation des fréquences d' <i>An. coluzzii</i> en fonction du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la température	20
Figure 12 : Variation des fréquences d' <i>An. arabiensis</i> en fonction du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la température	21

Liste des tableaux

Tableau I : Position systématique des anophèles (d'après Harbach, 2004).....	3
Tableau II : Variations des fréquences des espèces en fonction des types de gîtes	16
Tableau III : Fréquences des espèces en fonction de la turbidité, la présence de culicinsés, l'ensoleillement et la présence de végétation	19

Introduction

Le paludisme reste encore de nos jours l'un des problèmes majeurs de santé publique. En 2019, le nombre de cas enregistré a été estimé à 229 millions dans 87 pays d'endémie et celui des décès à 409 000 dont 67% chez les enfants de moins de 5 ans (OMS, 2019). Il sévit principalement en Afrique où sont enregistrés 82% des cas et 94% des décès (OMS, 2019). Cette situation s'explique entre autres par l'existence de conditions locales et environnementales favorables au développement de ses vecteurs (Pagès *et al.*, 2007). C'est le cas des espèces du complexe *Anopheles gambiae* qui assurent la plus grande partie de la transmission du paludisme en Afrique (Coetzee *et al.*, 2000). La plupart des études menées sur les espèces de ce complexe ont toujours été axées sur la bio-écologie des populations imaginales qui du fait de leurs exigences écologiques, sont adaptés à différents habitats. Chez les populations aquatiques, la distribution est liée à l'eau douce (cas des espèces *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. coluzzii* entre autres) ou saumâtres (cas des espèces *An. melas* et *An. merus*) avec différentes variantes selon les contextes. Les observations faites jusqu'ici mettent ainsi en évidence une préférence des stades aquatiques aux gîtes ouverts et ensoleillés (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gimnig *et al.*, 2001 ; Kindu *et al.*, 2018). Chez *An. arabiensis*, en particulier, une préférence supplémentaire spécifique à des habitats artificiels comme les zones de riziculture et de maraîchage a été observée (Githeko *et al.*, 1996 ; Robert *et al.*, 1998). Cependant, malgré ces différences, les espèces peuvent souvent être retrouvées dans un même habitat (Charlwood & Edoh, 1996 ; Minakawa *et al.*, 1999). Concernant les stades adultes, plusieurs observations ont montré une prédominance ou une présence exclusive temporaire ou spatiale d'une espèce par rapport aux autres (Touré *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont également été observées entre les espèces *An. gambiae* et *An. coluzzii* en zone de sympatrie au Sénégal (Niang *et al.*, 2019). Ainsi, même si ces variations sont souvent attribuées à des différences au niveau des habitats larvaires, les mécanismes ou les paramètres en jeu restent inconnus. Il demeure cependant, que l'habitat larvaire est un des plus importants déterminants de la distribution et de l'abondance des populations adultes. L'identification des paramètres qui influent sur la présence des populations vectorielles, la dynamique et la productivité des habitats larvaires est ainsi d'une importance capitale.

La présente étude est proposée dans ce contexte pour étudier dans une zone de sympatrie la ségrégation entre les populations d'*An. arabiensis*, d'*An. gambiae* et d'*An. coluzzii* à travers l'étude de l'influence de quelques paramètres biotiques et abiotiques dans un contexte où les seules

données disponibles ont été obtenues chez des populations adultes avec comme objectifs spécifiques :

- ✓ de décrire les types de gîtes
- ✓ d'identifier les paramètres majeurs impactant la présence et les fréquences de chacune des espèces

En plus de l'introduction, le mémoire comprend :

- ✓ le chapitre 1 qui présente une synthèse bibliographique,
- ✓ le chapitre 2 qui décrit le site d'étude et la méthodologie utilisée,
- ✓ le chapitre 3 qui présente les résultats obtenus et la discussion.

Le reste du document comprend les références bibliographiques et un annexe.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les vecteurs du paludisme

Le paludisme est une maladie endémique en Afrique. Il est dû à des parasites du genre *Plasmodium* dont la transmission est assurée par une femelle de moustique du genre *Anopheles*. On dénombre une cinquantaine d'espèces de ce genre impliquées dans la transmission mais seulement une vingtaine d'entre elles ont une importance épidémiologique (Pagès *et al.*, 2007). Les anophèles compétents pour transmettre le *Plasmodium* diffèrent selon la zone géographique, la majorité appartenant à des complexes ou des groupes d'espèces. En Afrique tropicale, on trouve entre autres, les espèces du complexe *An. gambiae*, du groupe *funestus* et du complexe *nili* (Carnevale & Robert, 2009).

1.1. Systématique

Les anophèles appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des Insectes, à la sous-classe des *Pterygota*, à l'ordre des diptères, au sous-ordre des Nématocères, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles* (Tableau I). Ils sont caractérisés par la présence de pattes articulées et leur corps est segmenté en trois parties : tête, thorax, abdomen. Ils présentent deux paires d'ailes dont une fonctionnelle.

Tableau I : Position systématique des anophèles (Harbach, 2004)

Embranchement	• <i>Arthropoda</i> : pattes articulées
Classe	• <i>Insecta</i> : corps segmenté en trois parties
Sous-classe	• <i>Pterygota</i> : avec des ailes
Ordre	• <i>Diptera</i> : avec 2 paires d'ailes
Sous-ordre	• <i>Nematocera</i> : avec antennes rondes et longues
Famille	• <i>Culicidae</i> : moustiques
Sous-famille	• <i>Anophelinae</i>
Genre	• <i>Anopheles</i>

1.2. Cycle de développement

Les anophèles sont des diptères holométaboles. Ils subissent des métamorphoses complètes. Leur cycle de développement comprend 2 phases : une phase aquatique et une phase aérienne.

1.2.1. Phase aquatique

Elle concerne les œufs, les larves et les nymphes.

- Les œufs

Les femelles d'anophèles pondent leurs œufs au vol à la surface de l'eau. Les œufs sont généralement fusiformes de couleur blanche au début puis brune. Ils portent deux flotteurs latéraux, ont une taille d'environ 0,5 millimètre de longueur et peuvent être jusqu'à 300 en une seule ponte. Ils éclosent 48h après l'oviposition et donnent naissance à la larve de stade I.

- Les larves

Elles sont aquatiques et mobiles. Leur évolution passe par 4 stades séparés par des mues. Leurs tailles varient entre 2 et 12 mm. Elles sont dépourvues de siphon respiratoire et respirent directement à la surface de l'eau grâce à des spiracles dorsaux. Au repos dans l'eau, elles ont une position horizontale, qui les différencient des larves des *Culicinae*. Elles se déplacent par saccades et se nourrissent par filtration à la surface de l'eau. La durée de vie larvaire est très variable selon l'espèce et les conditions du milieu (entre 1 à 3 semaines). A maturité, la larve de stade IV subit une métamorphose complète pour donner une nymphe.

- Les nymphes

C'est le dernier stade pré-imaginal. A la fin du stade larvaire IV, de nombreuses transformations se déroulent dont la lyse des muscles associée à l'élaboration d'un système adapté à la vie aérienne. La tête et l'abdomen sont fusionnés pour donner naissance à un céphalothorax globuleux. Les nymphes ne se nourrissent pas. Elles s'approvisionnent des réserves stockées durant le stade larvaire. Leur respiration est assurée par deux trompettes respiratoires situées à l'avant du céphalothorax. Leur durée de vie est de 24 à 48h. A maturité, la cuticule se fend longitudinalement et laisse apparaître le moustique adulte à la surface de l'eau (Carnevale & Robert, 2009 ; Fouet, 2010).

1.2.2. Phase aérienne

Elle concerne les adultes (mâles et femelles). Après l'émergence, les adultes restent quelques instants à la surface de l'eau pour le durcissement de leur cuticule. Ils ont un corps constitué de trois parties : tête, thorax et abdomen. Le dimorphisme sexuel est très marqué avec les mâles qui se distinguent facilement des femelles grâce à la présence d'antennes plumeuses et d'un génitalia visible à l'extrémité de l'abdomen. L'accouplement se déroule dans des essaims formés par les mâles souvent 24 à 48h après l'émergence. Le cycle gonotrophique (succession de prise de repas sanguin, maturation des œufs et ponte) débute après l'accouplement et est répété plusieurs fois durant la vie de la femelle (Figure 1). Sa durée varie entre 2 et 3 jours selon le statut de la femelle (nullipare ou pare, respectivement pour les femelles n'ayant jamais pondu ou celles ayant pondu au moins une fois). Elle est également tributaire de l'espèce et des conditions du milieu comme la température (48h chez *Anopheles gambiae* à 23°C). Après l'accouplement la femelle part à la recherche d'un hôte (homme ou animaux) pour la prise d'un repas de sang (Figure 1). Les femelles ne sont inséminées en général qu'une fois dans leur vie. Elles possèdent une spermathèque où sont stockés les spermatozoïdes après l'accouplement (Carnevale & Robert, 2009).

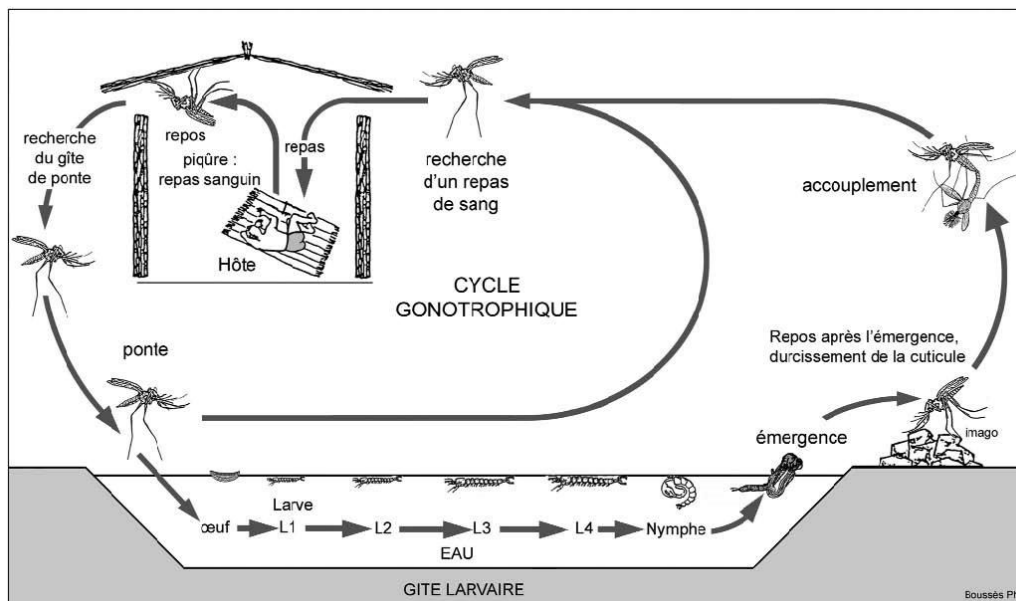


Figure 1 : Cycle de développement des moustiques du genre *Anopheles* (Carnevale & Robert, 2009)

2. Le complexe *Anopheles gambiae*

2.1. Composition

Le complexe *An. gambiae* a été décrit à la suite de plusieurs études utilisant différentes méthodes notamment l'étude de hérédité de la résistance à la dieldrine, les croisements expérimentaux, la cytogénétique et plus récemment la biologie moléculaire (Davidson, 1956 ; Paterson, 1964 ; Coluzzi *et al.*, 1979 ; Scott *et al.*, 1993). C'est ainsi qu'actuellement une dizaine d'espèces sont connues dans ce complexe (Figure 2). Il s'agit des espèces d'eau douce *An. gambiae* s.s., *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, des espèces d'eau saumâtres *An. melas* et *An. merus*, *An. bwambae* connu de sources minérales, d'*An. quadriannulatus*, d'*An. comorensis* et d'*An. amharicus* (Coetzee *et al.*, 2013). Une nouvelle espèce a été découverte (*An. fonteneilli*) dans des zones forestières du Gabon en Afrique Centrale (Barron *et al.*, 2019).

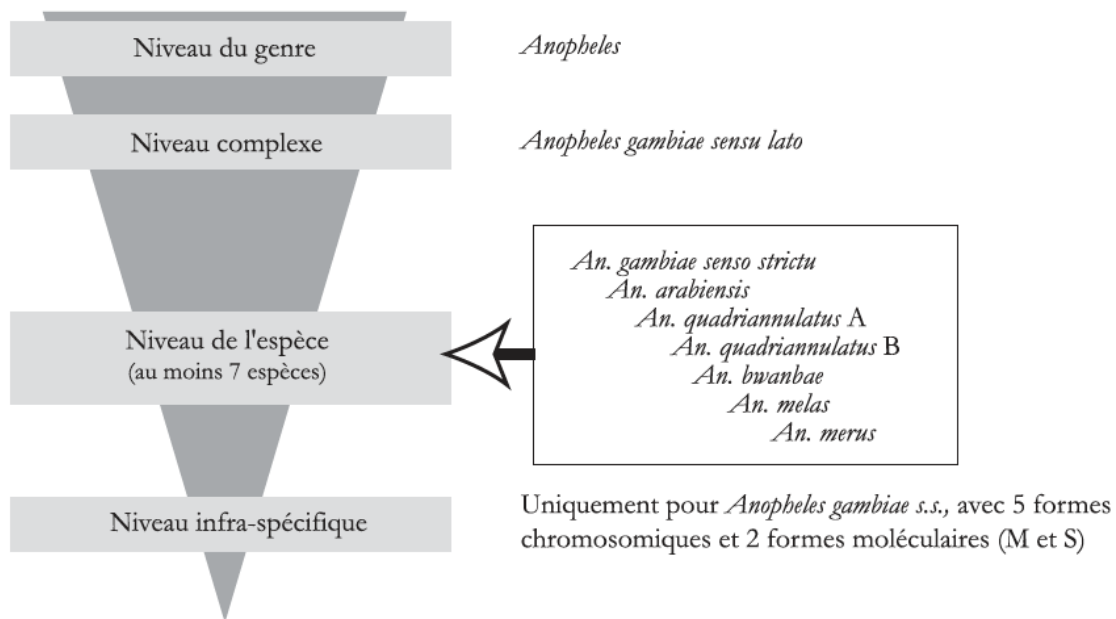


Figure 2 : Présentation schématique du complexe *Anopheles gambiae* (Carnevale & Robert, 2009)

2.2. Distribution

Les espèces du complexe *An. gambiae* sont localisées en Afrique tropicale et à Madagascar (Figure 3). Les espèces *An. melas* et *An. merus* sont associées à l'eau saumâtre et sont présentes respectivement le long des côtes d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique orientale. *An. quadriannulatus*

est présent en Afrique du Sud-est et *An. amharicus* en Ethiopie. Les larves d'*An. bwambae* se trouvent exclusivement dans les eaux minérales du parc national de la forêt Semliki dans l'est de l'Ouganda. *An. comorensis* a été découvert au niveau des îles du Comores (Lanzaro & Lee, 2013). *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* sont les espèces les plus largement répandues car elles sont présentes dans presque toute l'Afrique tropicale : *An. gambiae* est présent en Afrique de l'ouest et en Afrique centrale et dans des îles de l'Océan indien. *An. arabiensis* est surtout une espèce des zones de savane alors que *An. gambiae* et *An. coluzzii* prédominent dans les zones plus humides mais peuvent aussi être retrouvées dans les zones sahéliennes (Lanzaro & Lee, 2013).

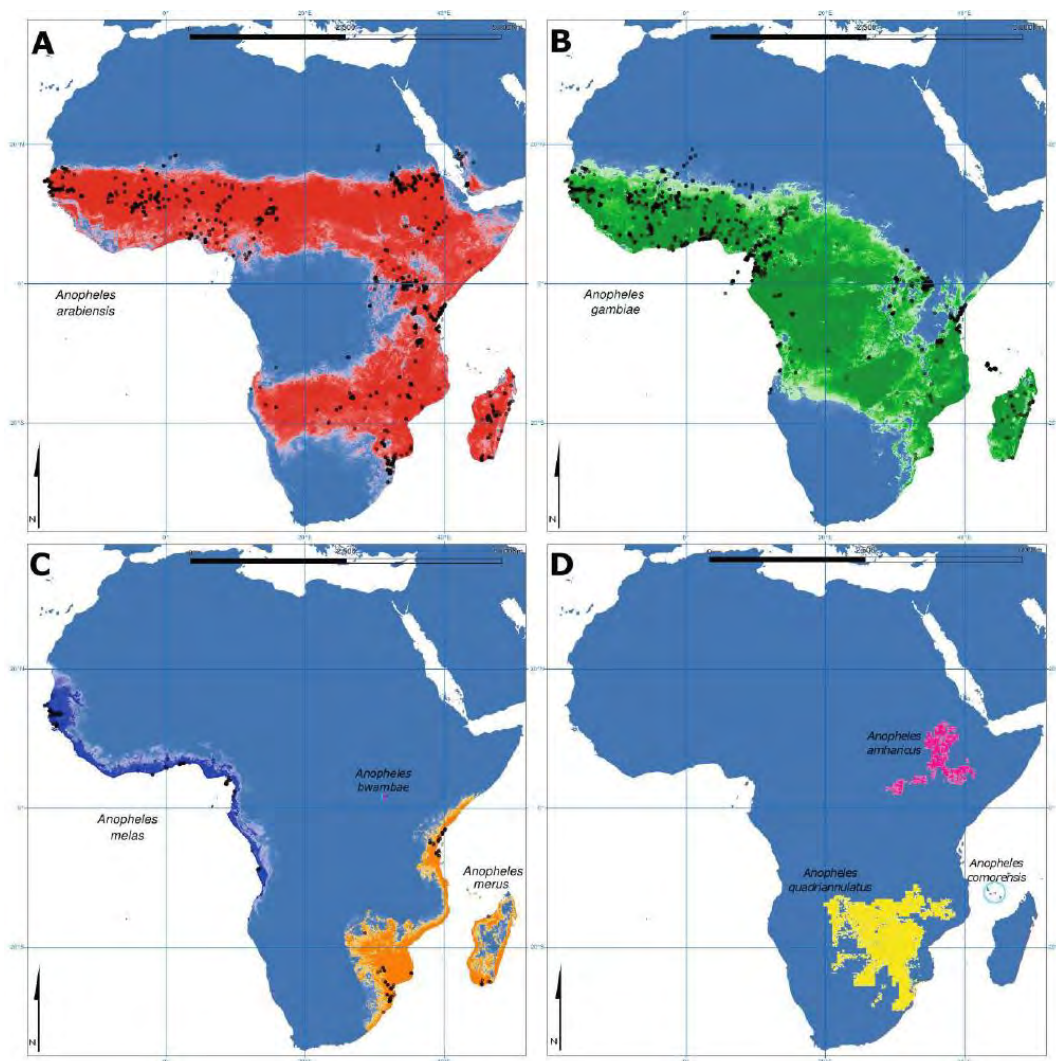


Figure 3 : Répartition des espèces du complexe *gambiae* en Afrique (d'après Lanzaro & Lee, 2013). A: *An. arabiensis* (rouge); B: *An. gambiae* s.s. (vert); C: *An. melas* (bleu), *An. merus*

(orange) et *An. bwambae* (cyan); D: *An. quadriannulatus* (ancienne espèce A) (jaune), *An. amharicus* (ancienne espèce *An. quadriannulatus* B) (magenta) et *An. comorensis* (cyan encerclé)

2.3. Caractéristiques bioécologiques

Parmi les espèces du complexe *gambiae*, *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis* et *An. coluzzii* sont les principaux vecteurs reconnus bien que le rôle vectoriel de certaines comme *An. melas* a été mis en évidence. Leur activité de piqure est nocturne et commence souvent au crépuscule et se déroule toute la nuit jusqu'au petit matin avec un pic dans la seconde partie de la nuit entre 3h et 5h du matin (Carnevale & Robert, 2009).

Les populations pré-imaginales d'*An. gambiae* se développent dans des collections d'eau souvent dépourvues de végétation (Betsi *et al.*, 2012 ; Kindu *et al.*, 2018). On les retrouve également dans les gîtes artificiels de grande taille particulièrement les rizières après repiquage et les bas fond à eaux stagnantes (Betsi *et al.*, 2012). Ces gîtes sont en général à des pH acides ou neutres et à des températures relativement basses en comparaison à ceux des *Aedes* et des *Culex* (Koumba *et al.*, 2018) et à des concentrations de sel inférieures à 30% à celle de l'eau de mer (Caputo *et al.*, 2008). Dans la zone du Sahel, les densités les plus élevées sont observées pendant la saison des pluies (Faye *et al.*, 1993). Le taux d'anthropophilie peut aller jusqu'à 74% pour *An. gambiae* (Diagne *et al.*, 1994).

An. arabiensis est souvent présent dans tous les bioclimats avec les fréquences les plus élevées dans les zones sub-humides, sèches et sub-arides (Leong Pock-Tsy *et al.*, 2003). Ses taux d'anthropophilie peuvent varier jusqu'à 70% dans certaines localités, ce qui en fait un bon vecteur. Concernant *An. melas*, elle est retrouvée dans des eaux saumâtres près des littorales ou des zones côtières. Elle a une faible importance épidémiologique à cause de sa faible longévité (Diop *et al.*, 2002).

3. Les vecteurs du paludisme au Sénégal

Le paludisme sévit durant toute l'année au Sénégal avec une recrudescence en saison des pluies surtout dans les zones rurales. Une vingtaine d'espèces d'anophèle est répertoriée dans le pays parmi lesquelles *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus* sont reconnues comme vecteurs majeurs (Diagne *et al.*, 1994 ; Niang *et al.*, 2019) alors que *An. pharoensis*, *An. nili* et *An. melas* sont considérés comme des vecteurs secondaires du fait de leur répartition focalisée et de leur faible participation dans la transmission (Dia *et al.*, 2003, 2008 ; Diop *et al.*, 2002).

An. gambiae et *An. coluzzii* sont prédominants dans les zones de savane humide alors que *An. arabiensis* est majoritairement présent dans les zones de savane sahéliennes et soudano-sahéliennes (Dia *et al.*, 2008 ; Lemasson *et al.*, 1997). D’ailleurs, *An. arabiensis* commence à étendre ses zones de prédominance vers le sud (Niang *et al.*, 2019). Il est le seul vecteur trouvé à Dakar et sa banlieue (Kane-Dia *et al.*, 2018).

An. funestus a été décrit dans toutes les zones bioclimatiques du Sénégal mais est plus abondant dans les zones avec des gîtes permanents ou semi-permanents avec une végétation dressée ou flottante (Fontenille *et al.*, 1997 ; Dia *et al.*, 2003 ; Samb *et al.*, 2016).

An. pharoensis est présent dans presque toutes les régions climatiques du Sénégal. Il présente en général une faible abondance à l’exception du delta et de la moyenne vallée du fleuve Sénégal et les zones de riziculture irriguée (Dia *et al.*, 2008 ; Faye *et al.*, 2011). *An. nili* est présent surtout dans la zone du sud-est du Sénégal où sa participation dans la transmission a été décrite (Dia *et al.*, 2003).

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Site d'étude

Le travail proposé a été réalisé dans l'arrondissement de Toubacouta et ses environs du fait de la présence sympatrique des espèces *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. coluzzii* et de l'observation de taux d'hybridation contrastés entre ces deux dernières (Caputo *et al.*, 2008 ; Nwakanma *et al.*, 2013). Cette zone est située dans le domaine soudanien entre les isohyètes 700 et 1000 mm (Figure 4). Le climat est de type soudanien avec une saison des pluies qui s'étend sur 4 à 5 mois de juin à septembre-octobre avec des amplitudes thermiques souvent au-dessus de 25°C. Les températures maximales sont enregistrées entre avril-mai (40°C) et octobre (35°C), alors que les températures minimales souvent autour de 15°C sont enregistrées en décembre-janvier et entre 20°C et 25°C le reste de l'année.

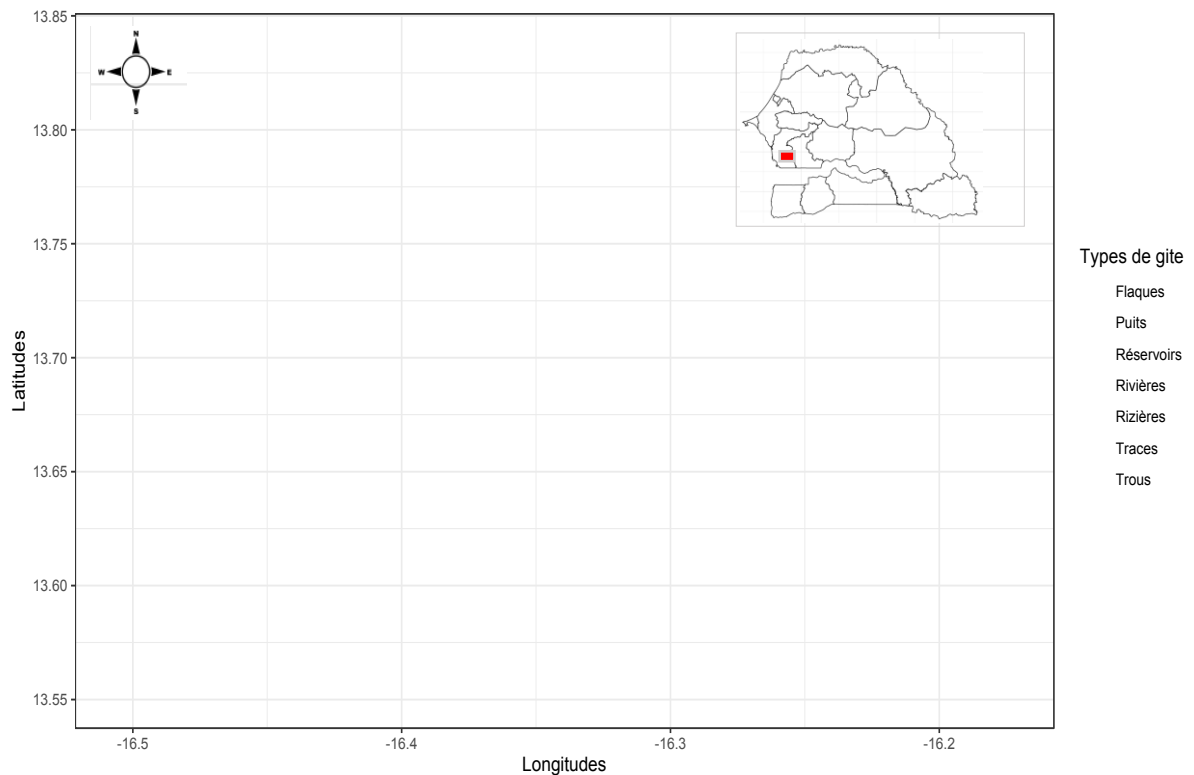


Figure 4 : Localisation de la zone d'étude

2. Échantillonnage des stades aquatiques et recueil des paramètres physico-chimiques et biologiques

Les stades aquatiques ont été collectés dans des collections d'eau en octobre 2020. Après inspection au niveau de chaque gîte, les larves ont été prélevées soit par la méthode du « dipping » soit par la méthode du « pipetting » selon la taille des gîtes puis placées dans des pots portant le numéro du gîte. Pour chaque gîte, la présence ou l'absence de culicidés autres que des anophèles, de la végétation, de la turbidité et de l'ensoleillement a été notée. Après la mesure de la taille des gîtes (longueur, largeur, profondeur) à l'aide d'un décimètre, les paramètres suivants ont ensuite été mesurés à l'aide d'un testeur portable de terrain (SD Card Real time Datalogger) : la température, la quantité d'oxygène dissout, la teneur en sel et le pH.

Les larves ont ensuite été triées au laboratoire puis conservées dans des tubes contenant de l'éthanol 70°.

3. Traitement au laboratoire

3.1. Extraction d'ADN

Pour chaque larve, l'ADN a été extrait à partir de la méthode du CTAB 2% (Morlais *et al.*, 2004). Chaque larve a été placée dans un tube individuel puis broyée dans 200µl de CTAB 2%. Les tubes contenant les broyats ont ensuite été placés dans un bain sec à 65°C pendant 5 min au bout desquelles 200µl de chloroforme ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 12 000 tours/min pendant 5 min puis les surnageants ont été récupérés et placés dans de nouveaux tubes stériles dans lesquels 200µl d'Isopropanol ont été ajoutés. Après mélange de leur contenu, les tubes ont été centrifugés à 12 000 tours/min pendant 15 min au bout desquelles la partie liquide a été vidée puis 200µl d'alcool 70° ont été ajoutés à chaque tube. Les étapes ultimes de l'extraction ont ensuite consisté à centrifuger les tubes à 12 000 tours/min, vidage du contenu des tubes, séchage au Speed Vac pendant 5 min puis ajout de 20µl d'eau distillée. Les tubes ont ensuite été maintenus sur la paillasse pendant au moins 12h puis conservés à -20°C avant les tests PCR.

3.2. Identification des espèces du complexe *An. gambiae* par PCR

Elle a été faite suivant les techniques de Scott *et al.*, (1993) et Fanello *et al.*, (2002). L'amplification a été effectuée dans un mélange contenant de l'eau, un tampon, des désoxynucléotides (dNTP), des amorces (une commune aux trois espèces *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas* et une spécifique à chaque espèce), une polymérase et l'ADN à amplifier (Annexe). L'amplification a été

effectuée dans un volume final de 12,5µl par tube contenant un tampon 1X avec du MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 5 pmoles de chaque amorce (amorce UN commune aux trois espèces, amorce AG spécifique à *An. gambiae*, amorce AR spécifique à *An. arabiensis* et amorce ML spécifique à *An. melas*), 0,25 unité de Polymérase et 2µl d'ADN. Elle a été effectuée suivant les conditions suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 2min suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 s, hybridation à 50°C pendant 15 s et une élongation à 72°C pendant 15 s. Ces étapes ont été suivies par une élongation finale à 72°C pendant 5 min. A la fin de l'amplification, les amplicons ont été migrés sur un gel d'agarose à 2,5%. Les bandes attendues sont 315 pb pour *An. arabiensis*, 390 pb pour *An. gambiae* s.s. et 464 pb pour *An. melas* (Figure 5). L'identification d'*An. gambiae* et d'*An. coluzzii* a été effectuée après digestion d'une partie des amplicons d'*An. gambiae* s.s. par l'enzyme de restriction *Hha1* à 37°C pendant 4h. Les amplicons digérés ont ensuite été migrés sur un gel d'agarose à 2,5%. La lecture des résultats PCR a été effectuée à l'aide d'un marqueur de taille moléculaire à 100 paires de base utilisé simultanément dans deux puits du gel pour chaque peigne au cours de la migration. Les bandes attendues sont 367 pb pour *An. coluzzii*, 257 et 110 pb pour *An. gambiae*.

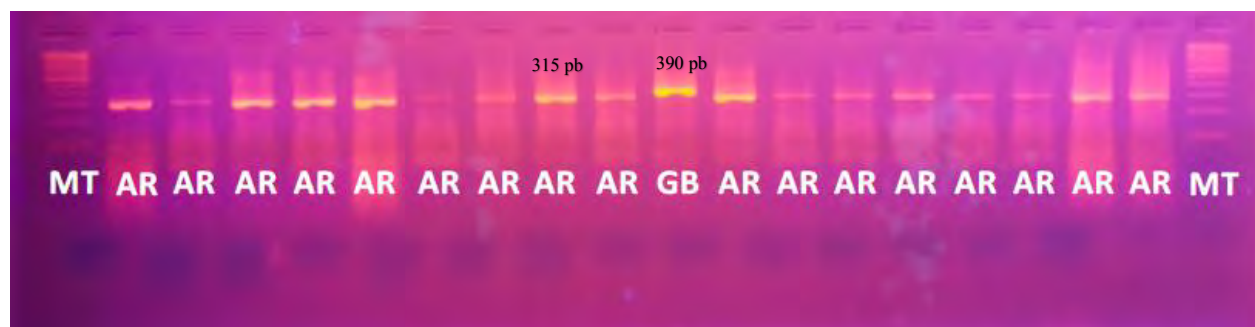


Figure 5 : Photo d'un gel d'agarose après migration. MT : marqueur de taille, AR : *An. arabiensis*, GB : *An. gambiae*

4. Analyse des résultats

Les gîtes investigués ont été classés selon leur type, leur statut (positif ou négatif suivant la présence ou l'absence de larves d'anophèles), leur nature (artificiel ou naturel suivant l'action ou non de l'homme) et leur taille (gîtes de petite taille avec la taille inférieure à 50 m constitués essentiellement de flaques d'eau, de traces de pas, de puits, de réservoirs et de trous d'emprunt, de

gites de taille intermédiaire avec la taille comprise entre 50 et 100 m constitués de bords de rivière et de flaques d'eau, et de gites de grande taille avec la taille supérieure à 100 m constitués de bords de rivière et de rizière).

Les données obtenues ont été saisies dans une base de données à l'aide du tableur Excel 2016. L'abondance relative des gites a été définie par le rapport en pourcentage entre le nombre de gites prospectés pour chaque type de gite sur le nombre total de gite. Les fréquences des espèces du complexe *An. gambiae* ont été estimées par le rapport en pourcentage entre le nombre d'individus identifiés pour chacune des espèces sur le nombre total d'individus identifiés. La comparaison des pourcentages a été effectuée à l'aide du test du χ^2 et le test exact de Fisher avec un seuil de significativité fixé à 5%. L'influence des paramètres mesurés (température, pH, oxygène dissout et salinité) a été étudiée à travers l'étude de la corrélation entre ces paramètres et les fréquences relatives des espèces.

Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2016).

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Typologie, abondance et positivité des gîtes prospectés

Les types de gîtes prospectés au cours de cette étude sont présentés à la Figure 6. Il s'agissait de flaques d'eau issues des pluies, de trous d'emprunt, de réservoirs d'eau, de puits creusés dans le sol, de bords de rivières, de traces de pas d'animaux et de rizières.



Figure 6 : Types de gîtes investigués dans la zone de Toubacouta en octobre 2020

Au total, 47 gîtes ont été investigués. Les flaques d'eau issues des pluies (17 gîtes) ont été prédominantes suivies des bords de rivières (9 gîtes) et des puits creusés dans le sol (8 gîtes). Les fréquences respectives étaient de 36,2%, 19,1% et 17%. Ces gîtes étaient suivies des traces de pas

(5 gites représentant 10,6%) et des rizières (4 gites représentant 8,5%). Les réservoirs d'eau et les trous d'emprunt ont représenté 4,3% avec 2 gites pour chacun des deux types (Figure 7).

A l'exception des flaques d'eau, des traces de pas et des puits, tous les autres types de gites hébergeaient des larves d'anophèles. Les taux de positivité des flaques, des traces de pas et des puits étaient respectivement de 94,1%, 80% et 75% (Figure 7).

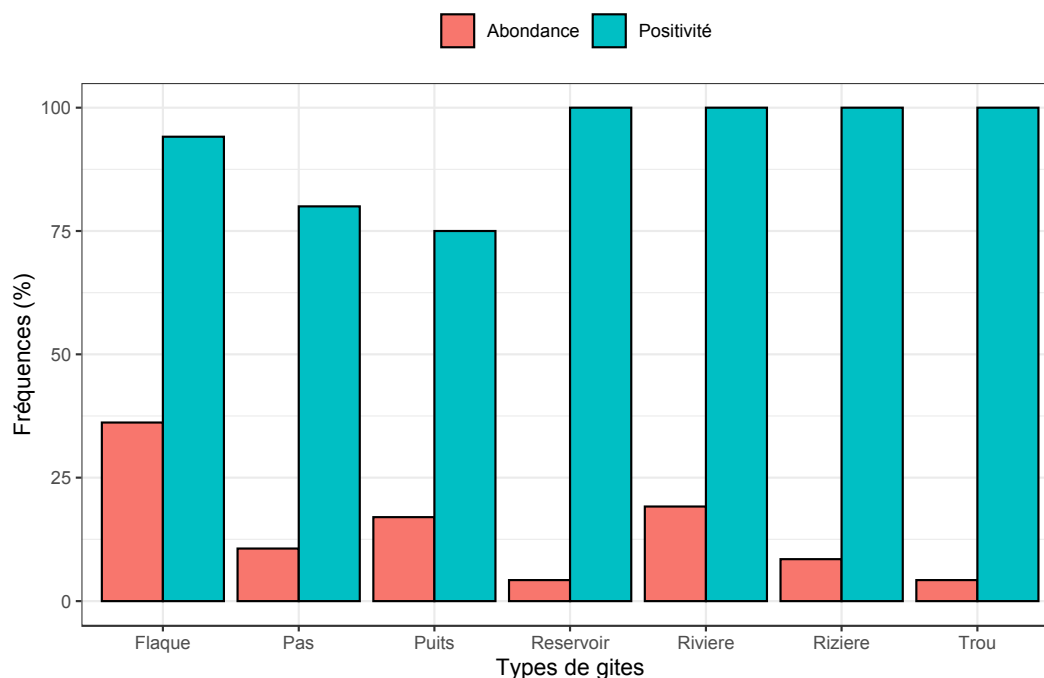


Figure 7 : Typologie et positivité des gites étudiés

1.2. Identification des espèces du complexe *An. gambiae* par PCR

Au total, les ADN de 1066 larves ont été extraits et analysés par PCR pour identifier les espèces du complexe *An. gambiae*. *An. arabiensis* a été l'espèce prédominante (92,7% avec 988 des spécimens identifiés) suivie d'*An. gambiae* (4,6% avec 49 spécimens identifiés) et d'*An. coluzzii* (2,6% avec 28 spécimens identifiés). Un seul hybride entre *An. gambiae* et *An. coluzzii* a été identifié parmi les larves collectées au bord d'une rivière.

1.3. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction des types de gîte

Anopheles arabiensis a été collecté dans tous les types de gîtes (Tableau II). D'ailleurs, c'est la seule espèce collectée dans les trous d'emprunt. Globalement, quel que soit le type de gîte considéré, elle a été l'espèce prédominante. Ses fréquences ont varié entre 87% dans les rizières à 100% dans les trous d'emprunt et ont été statistiquement différentes entre les différents types de gîte ($\chi^2=24,67$, ddl=6, $p=0,0003$).

An. coluzzii a été absente des traces de pas, des trous d'emprunt et des rizières. Ses fréquences ont été 2,3%, 1,6%, 2,4% et 5,9% respectivement au niveau des flaques d'eau, des puits, des réservoirs et des bords de rivières (Tableau II). Elles ont été comparables entre ces 4 types de gîte ($\chi^2=7,91$, ddl= 3, $p=0,05$).

An. gambiae a été présent au niveau de tous les gîtes à l'exception des réservoirs et des trous d'emprunt. Dans les gîtes où il a été retrouvé, ses fréquences ont varié entre 0,8% au niveau des puits et 6,7% aux bords des rivières. Ses fréquences dans les autres types de gîtes ont été de 5,6%, 4,2%, et 5,6% respectivement au niveau des flaques, des traces de pas, au bord des rivières et dans les rizières (Tableau II). Aucune différence significative n'a été observée entre ces fréquences ($\chi^2=6,4$, ddl = 4, $p= 0,17$).

Tableau II : Variations des fréquences des espèces en fonction des types de gîtes

Type de gîtes	<i>An. arabiensis</i>		<i>An. coluzzii</i>		<i>An. gambiae</i>		Hybride		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Flaques	398	92,1	10	2,3	24	5,6	0	0	432
Pas	115	95,8	0	0	5	4,2	0	0	120
Puits	120	97,6	2	1,6	1	0,8	0	0	123
Réservoirs	40	97,6	1	2,4	0	0	0	0	41
Rivières	221	87	15	5,9	17	6,7	1	0,4	254
Rizières	34	94,4	0	0	2	5,6	0	0	36
Trous	60	100	0	0	0	0	0	0	60

N : nombre, % : pourcentage

1.4. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction de la nature du gîte

L'identification des espèces par PCR a permis de constater que quelle que soit la nature du gîte, *An. arabiensis* a été l'espèce prédominante (Figure 8). Ses fréquences ont été de 90% dans les gîtes naturels et 97,6% dans les gîtes artificiels et ont été significativement différentes ($p=0,0007$). Pour *An. gambiae* et *An. coluzzii*, les fréquences ont été plus élevées au niveau des gîtes naturels qu'au niveau des gîtes artificiels et ont également été significativement différentes entre les deux types de gîtes pour *An. gambiae* ($p=0,004$). Elles ont été comparables pour *An. coluzzii* ($p=0,14$).

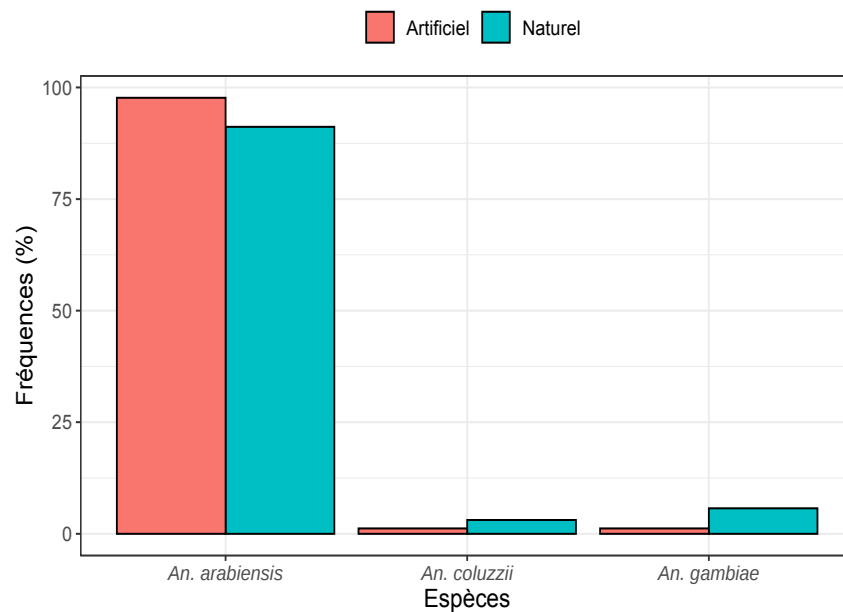


Figure 8 : Variations des fréquences des espèces en fonction de la nature des gîtes

1.5. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction de la taille des gîtes

Les fréquences d'*An. arabiensis* ont été de 8,8% pour les gîtes de grande taille, 9,8% pour les gîtes de taille intermédiaire et 81,4% pour les gîtes de petite taille (Figure 9). Chez *An. coluzzii*, les fréquences respectives ont été de 0%, 60,7% et 39,3% alors que chez *An. gambiae*, elles ont été de 57,1%, 36,7% et 6,1%.

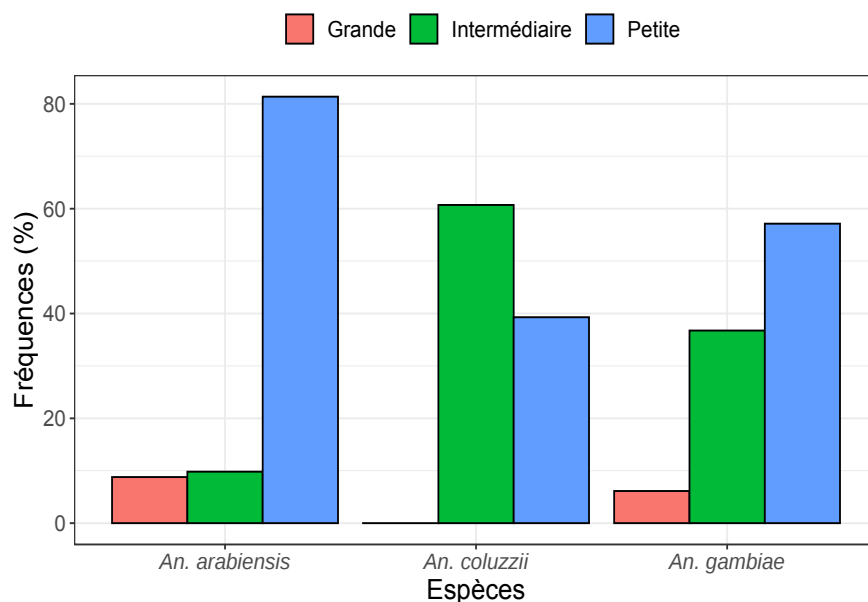


Figure 9 : Variations des fréquences des espèces en fonction de la taille des gîtes

1.6. Variations des fréquences de chaque espèce en fonction de la turbidité, de l'ensoleillement, de la présence de culicines et de la végétation

Les fréquences d'*An. gambiae* observées en présence de culicines et d'ensoleillement ont été significativement différentes (respectivement $p=0,003$ et $p=0,009$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée ni avec la turbidité ($p=0,42$) ni avec la présence de végétation ($p=0,41$). Les fréquences d'*An. arabiensis* ont été de 47% dans les gîtes turbides, 76% dans les gîtes sans culicines, 80% dans les gîtes ensoleillés et 58% dans les gîtes avec végétation. Les variations de fréquences entre les gîtes ensoleillés et les gîtes non ensoleillés ont été statistiquement significatives ($p=0,004$), ainsi que celles entre les gîtes sans culicines et ceux avec culicines ($p<0,01$). Il en a été de même pour *An. coluzzii* en présence ou en absence d'ensoleillement ($p<0,01$). Cependant, aucune variation significative n'a été observée en considérant la turbidité, la présence de culicines et la végétation (Tableau III).

Tableau III : Fréquences des espèces en fonction de la turbidité, la présence de culicinés, l'ensoleillement et la présence de végétation

Espèces	Turbidité			Culicinés			Ensoleillement			Végétation		
	NT	T	p	A	P	p	NE	E	p	SV	AV	p
<i>An. gambiae</i>	4	5,2	0,42	5,7	0,8	0,003	1	5,5	0,009	3,9	5,1	0,41
<i>An. arabiensis</i>	92,5	93	0,81	91,2	98,3	<0,01	97,6	91,6	0,004	91,4	91,8	0,19
<i>An. coluzzii</i>	3,6	1,8	0,1	3,2	0,8	0,081	1,4	2,9	<0,01	2	3	0,42

NT : non turbide, T : turbide, A : absent, P : présent, NE : non ensoleillé, E : ensoleillé, SV : sans végétation, AV : avec végétation, p : seuil de significativité

1.7. Influence du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la salinité

Cette influence a été étudiée à travers l'étude de la corrélation entre les fréquences d'*An. arabiensis*, d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* et le pH, la température, l'oxygène dissout et la salinité.

Chez *An. gambiae* et *An. coluzzii*, une corrélation positive non significative a été observée avec la température, l'oxygène dissout et la salinité (Figures 10 et 11). Cependant lorsque le pH est considéré, une corrélation négative significative est observée ($r=-0,53$, $p=0,0002$ pour *An. gambiae* et $r=-0,49$, $p=0,0009$ pour *An. coluzzii*).

Chez *An. arabiensis*, des tendances contraires à celles observées chez *An. gambiae* et *An. coluzzii* ont été notées. Alors qu'une corrélation négative non significative a été observée avec la température, l'oxygène dissout et la salinité, une corrélation positive significative a été observée avec le pH (Figure 12).

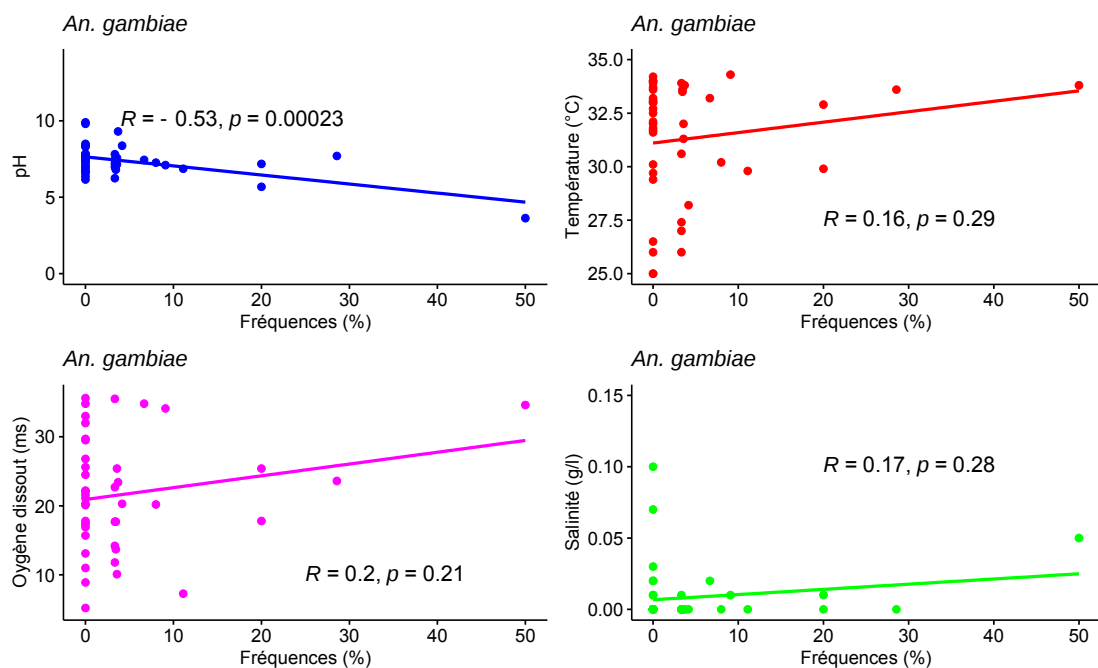


Figure 10 : Variation des fréquences d'*An. gambiae* en fonction du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la température

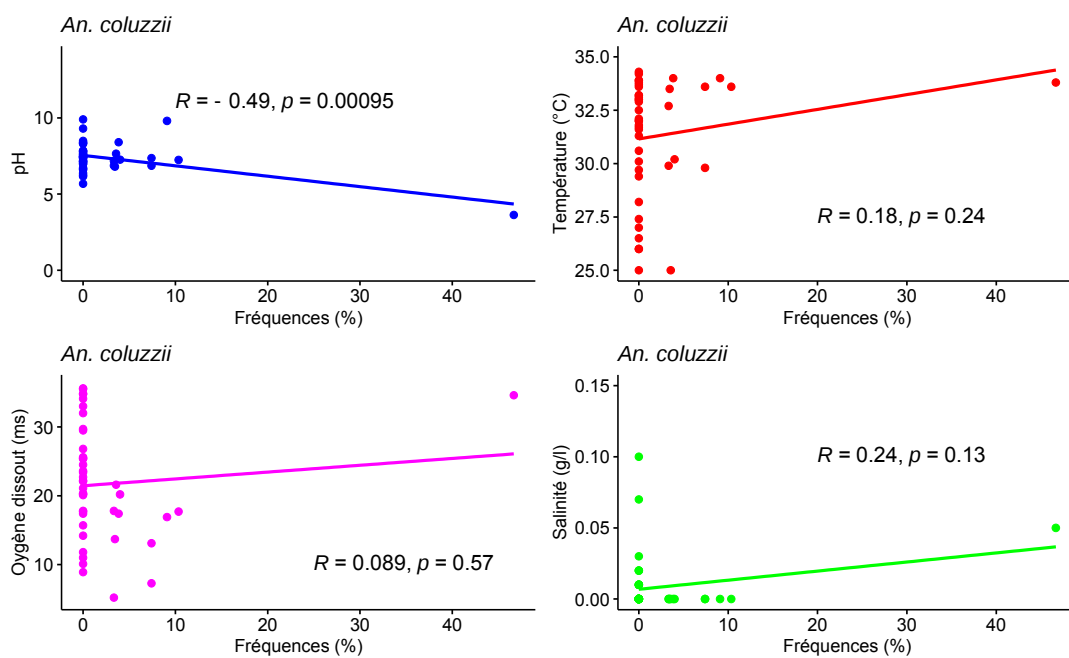


Figure 11 : Variation des fréquences d'*An. coluzzii* en fonction du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la température

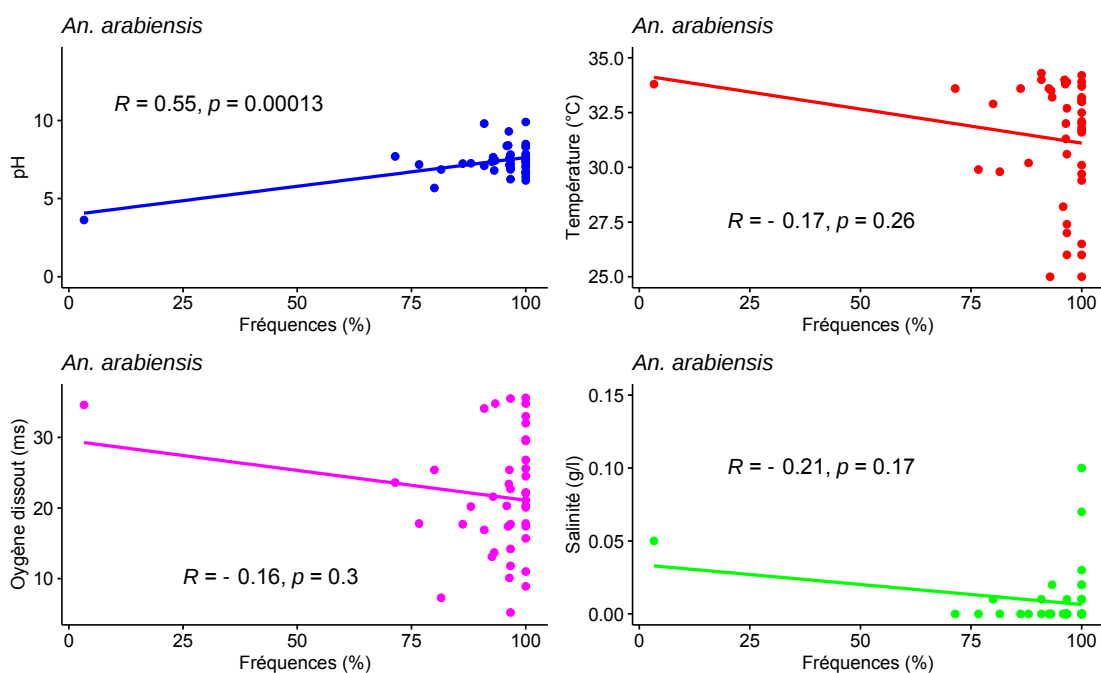


Figure 12 : Variation des fréquences d'*An. arabiensis* en fonction du pH, de la température, de l'oxygène dissout et de la température

2. Discussion

La présente étude a été conduite dans le but d'identifier les paramètres prépondérants dans la ségrégation entre les espèces du complexe *An. gambiae*. Les flaques d'eau, les bords de rivière et les puits creusés dans le sol ont été les gîtes larvaires prédominants. Ceci pourrait s'expliquer par le caractère relativement permanent de ces types de gîtes puisque l'étude a été effectuée en octobre en fin de saison des pluies, la majorité des autres types de gîtes avait déjà disparue.

An. arabiensis a été l'espèce prédominante dans la zone d'étude dans chacun des 7 types de gîtes investigués. La prédominance de cette espèce parmi les populations larvaires confirme les résultats obtenus dans la zone sur des populations imaginales (Niang *et al.*, 2013 ; Doucouré *et al.*, 2020). Cette prédominance peut être expliquée entre autres, par l'adaptation de cette espèce aux zones de savane sahéliennes et soudaniennes (Lemasson *et al.*, 1997 ; Fontenille *et al.*, 1997) même si depuis quelques années, il est noté sa prédominance dans les zones plus humides vers le sud (Niang *et al.*,

2019). *An. gambiae* et *An. coluzzii* ainsi que les hybrides entre ces deux espèces coexistent dans la zone avec *An. arabiensis*.

L'analyse des fréquences des espèces en fonction de la nature et de la taille des gîtes a montré d'une part que *An. arabiensis* est plus abondant dans les gîtes artificiels et d'autre part c'est surtout dans les gîtes de petite taille que ses fréquences les plus élevées ont été observées avec *An. gambiae* alors que *An. coluzzii* a été plus fréquent dans les gîtes de taille intermédiaire. D'une manière générale, les gîtes caractéristiques des espèces du complexe *An. gambiae* sont souvent des gîtes naturels. La présence dans des gîtes artificiels comme ce qui a été observé chez *An. arabiensis* peut s'expliquer par une plus grande disponibilité de ces types de gîte dans la zone ou par le fait que ces types de gîte sont moins soumis aux différents mouvements de l'eau et permettent ainsi une meilleure prolifération (Soleimani-Ahmadi *et al.*, 2013). Concernant la taille des gîtes, les résultats obtenus chez *An. arabiensis* et *An. gambiae* confirment ceux de Chirebvu & Chimbari (2015) et de Opoku *et al.*, (2007). Cependant, chez *An. coluzzii*, des études conduites au Burkina Faso par Gimmonneau *et al.*, (2012) ont montré son abondance dans des gîtes de grande taille, ce qui est différent de ce qui a été observé au cours de notre étude.

A la différence de la turbidité et de la présence de végétation qui n'ont pas impacté les fréquences des 3 espèces, l'ensoleillement et la présence d'autres culicidés ont significativement impacté les fréquences des espèces (à l'exception de la présence des culicidés pour *An. coluzzii*). L'impact de l'ensoleillement sur les espèces du complexe *An. gambiae* est connu depuis longtemps (Gillies & De Meillon, 1968). Pour la turbidité et la végétation, Gimnig *et al.*, (2001) avaient observé qu'*An. gambiae* et *An. arabiensis* étaient positivement associés à une augmentation de la turbidité contrairement à la présence de végétation. Concernant cette dernière, d'autres études ont mis en évidence des résultats contradictoires (Hinne *et al.*, 2021) ; la présence des espèces étant associée à une faible couverture végétale qui favorise une meilleure exposition des gîtes à l'ensoleillement. D'un autre côté, une exposition intense favorise une augmentation de la température qui est un facteur important dans le développement et la survie des populations larvaires (Afrane *et al.*, 2005). L'étude des facteurs abiotiques (pH, température, oxygène dissout et salinité) a montré des profils différents ; *An. gambiae* et *An. coluzzii* présentant des profils différents par rapport à *An. arabiensis*. Si la température, la quantité d'oxygène dissout et la salinité ont été corrélés négativement avec les fréquences d'*An. arabiensis*, le contraire a été observé chez *An. gambiae* et *An. coluzzii*. Cependant, une corrélation positive significative a été observée chez *An. arabiensis*

et le contraire chez *An. gambiae* et *An. coluzzii* pour le pH. Les deux cas ont été respectivement observés par Oyewole *et al.*, (2009) et Adebote *et al.*, (2008). Ces résultats expriment ainsi des préférences différentes entre *An. arabiensis* et les espèces *An. gambiae* et *An. coluzzii*.

3. Conclusion

Cette étude a permis de confirmer la prédominance de l'espèce *An. arabiensis* dans la zone. La ségrégation entre les espèces semble bien marquée comparativement aux études effectuées auparavant sur des populations imaginales. Les paramètres associés aux espèces étudiées sont complexes. Il est ainsi possible au-delà des différences observées, un ou des effets combinés entre certains paramètres qui pourraient contribuer aux variations de fréquences observées. Ainsi du fait du caractère changeant de la nature des gîtes avec le temps, il est ainsi nécessaire de conduire des études dans l'espace et le temps afin de confirmer ces résultats et étudier l'impact des paramètres étudiés sur la ségrégation des espèces.

Références bibliographiques

1. **Adebote D.A., Oniye S.J. & Muhammed Y.A., 2008.** Studies on mosquito breeding in rock pools on inselbergs around Zaria, northern Nigeria. *Journal of Vector Borne Disease* 45: 21-28.
2. **Afrane Y.A., Lawson B.W., Githeko A.K. & Yan G., 2005.** Effects of microclimatic changes caused by land use and land cover on duration of gonotrophic cycles of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in western Kenya highlands. *Journal of Medical Entomology* 45: 974-980.
3. **Barron M.G., Paupy C., Rahola N., Akone-Ella O., Ngangue M.F., Wilson-Bahun T.A., Pombi M., Kengne P., Costantini C., Simard F., Gonzalez J. & Ayala D., 2018.** A new species in the *Anopheles gambiae* complex reveals new evolutionary relationships between vector and non-vector species. *BioRxiv/CC-BY-NC-ND*, <https://doi.org/10.1101/460667>.
4. **Betsi A.N., Tchicaya E.S. & Koudou B.G., 2012.** Forte prolifération de larves d'*An. gambiae* et *An. funestus* en milieux rizicoles irrigués et non irrigués dans la région forestière Ouest de la Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique* 105: 220-229.
5. **Caputo B., Nwakanma D., Jawara M., Adiamoh M., Dia I., Konate L., Petrarca V., Conway D.J. & della Torre A., 2008.** *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s. *Malaria Journal* 7: 182.
6. **Carnevale P. & Robert V., 2009.** Les anophèles : biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. IRD Éditions. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.10374>. 391p
7. **Charlwood J.D. & Edoh D., 1996.** Polymerase chain reaction used to describe larval habitat use by *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in the environs of Ifakara, Tanzania. *Journal of Medical Entomology* 22: 202-204.
8. **Chirebvu E. & Chimbari M.J., 2014.** Characteristics of *Anopheles arabiensis* larval habitats in Tubu village, Botswana. *Journal of Vector Ecology* 40 (1):129-138.
9. **Coetzee M., Craig M. & le Sueur D., 2000.** Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today* 16, 74–77.
10. **Coetzee M., Hunt R.H., Wilkerson R., Torre A.D., Coulibaly M.B. & Besansky N.J., 2013.** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619: 246-274.
11. **Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V. & Di Deco M.A., 1979.** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (5): 483-497.
12. **Davidson G. 1956** - Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* Giles. *Nature* 178 (4535) : 705-706.

13. **Dia A.K., Gueye O.K., Niang E.H.A., Diédhiou S.M., Sy M.D., Konaté A., Samb B., Diop A., Konaté L. & Faye O., 2018.** Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* populations from Dakar and its suburbs: role of target site and metabolic resistance mechanisms. *Malaria Journal* 17: 116.
14. **Dia I., Konate L., Samb B., Sarr J.B., Diop A., Rogerie F., Faye M., Riveau G., Remoue F., Diallo M. & Fontenille D., 2008.** Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Tropica* 105: 145-153.
15. **Dia I., Diop T., Rakotoarivony I., Kengne P. & Fontenille D., 2003.** Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *Journal Medical Entomology* 40 (3): 279-283.
16. **Diagne N., Fontenille D., Konate L., Faye O., Lamizana M.T., Legros F., Molez J.F. & Trape J.F., 1995.** Les Anophèles Du Sénégal : Liste Commentée et Illustrée. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 4: 267-277.
17. **Diop A., Molez J.F., Konaté L., Fontenille D., Gaye O., Diouf M., Diagne M. & Faye O., 2002.** Rôle d'*Anopheles melas* Theobald (1903) dans la transmission du paludisme dans la mangrove du Saloum (Sénégal). *Parasite* 9 (3): 239-246.
18. **Doucouré S., Thiaw O., Wotodjo A.N., Bouganali C., Diagne N., Parola P. & Sokhna C., 2020.** *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus* biting patterns in Dielmo, an area of low level exposure to malaria vectors. *Malaria Journal* 19: 230.
19. **Fanello C., Santolamazza F. & della Torre A., 2002.** Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology* 16 (4): 461-464.
20. **Faye O., Konate L. & Diop A., 2011.** Profil entomologique du paludisme au Sénégal. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Dakar, Sénégal, p. 47.
21. **Faye O., Fontenille D., Herve J.P., Diack P.A., Diallo S. & Mouchet J., 1993.** Le Paludisme en zone sahélienne du Sénégal. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* 73: 21-23.
22. **Fontenille D., Lochouarn L., Diatta M., Sokhna C., Dia I., Diagne N., Lemasson J.J., Ba K., Tall A., Rogier C. & Trape J.F., 1997.** High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56: 247-253.
23. **Fouet C., 2010.** Polymorphisme chromosomique et adaptation à l'aridité chez *An. gambiae sensu stricto*. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 58p

24. **Gillies M.T. & De Meillon B., 1968.** The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. Johannesburg, *Publication of The South African Institute for Medical Research* 343.
25. **Gimnig J.E., Ombok M., Kamau L. & Hawley W.A., 2001.** Characteristics of Larval *Anopheline* (Diptera : *Culicidae*) Habitats in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology* 38 (2): 282-288.
26. **Gimonneau G., Pombi M., Choisy M., Morand S., Dabiré R.K. & Simard F., 2012.** Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 26: 9-17.
27. **Githeko A.K., Service M.W., Mbogo C.M. & Atieli F.K., 1996.** Resting behavior, ecology and genetics of malaria vectors in a large-scale agricultural area of western Kenya. *Parassitologia* 58: 307-316.
28. **Harbach R.E., 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research* 94 (6): 537-553.
29. **Hinne I.A., Attah S.K., Mensah B.A., Forson A.O. & Afrane Y.A., 2021.** Larval habitat diversity and *Anopheles* mosquito species distribution in different ecological zones in Ghana. *Parasites & Vectors* 14: 193.
30. **Kindu M., Aklilu E., Balkew M. & Gebre-Michael T., 2018.** Study on the species composition and ecology of anophelines in Addis Zemen, South Gondor, Ethiopia. *Parasites & Vectors* 11: 215.
31. **Koumba A.A., Koumbal C.R.Z., Nguema R.M., Djogbenou L.S., Ondo P.O., Ketoh G. K., Comlan P., M'batchi B. & Mavoungou J.F., 2018.** Distribution spatiale et saisonnière des gîtes larvaires des moustiques dans les espaces agricoles de la Zone de Mouilla, Gabon. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 12 (4): 1754-1769.
32. **Lanzaro G.C. & Lee Y., 2013.** Speciation in *Anopheles gambiae*: the distribution of genetic polymorphism and patterns of reproductive isolation among natural populations. In “*Anopheles mosquitoes: new insights into malaria vectors*”. Manguin S. & Mouchet J. Rijeka, Intech Book: 173-196.
33. **Lemasson J.J., Fontenille D., Lochouart L., Dia I., Simard F., Ba K., Diop A., Diatta M. & Molez J.F., 1997.** Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: *Culicidae*) in Barkédji, a sahelian area of Senegal. *Journal of Medical Entomology* 34 (4): 396-403.
34. **Leong Pock-Tsy J.M., Duchemin J.B., Marrama L., Rabarison P., Le Goff G., Rajaonarivelo V. & Robert V., 2003.** Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal* 2: 33.

35. **Minakawa N., Mutero C.M., Githure J.I., Beier J.C. & Yan G., 1999.** Spatial distribution and habitat characterization of anopheline mosquito larvae in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 1010-1016.
36. **Morlais I., Ponçon N., Simard F., Cohuet A. & Fontenille D., 2004.** Intraspecific nucleotide variation in *Anopheles gambiae*: new insights into the biology of malaria vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (6): 795-802.
37. **Niang E.H.A., Touré A., Ngom E.H.M., Konaté L., Faye O., Diallo M. & Dia I., 2013.** Malaria Transmission Pattern in an Area Selected for Clinical Trials in the Sudanian Area of Senegal (West Africa). *Journal of Tropical Medicine* 2013: 907375.
38. **Niang E.H.A., Konaté L., Faye O., Diallo M. & Dia I., 2019.** Vector bionomics and malaria transmission in an area of sympatry of *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae*. *Acta Tropica* 189: 129-136.
39. **Nkondjio C. A., Ndo C., Costantini C., Awono-Ambene P., Fontenille D. & Simard F., 2009.** Distribution and larval habitat characterization of *Anopheles moucheti*, *Anopheles nili*, and other malaria vectors in river networks of southern Cameroon. *Acta Tropica* 112: 270-276.
40. **Nwakanma D.C., Neafsey D.E., Jawara M., Adiamoh M., Lund E., Rodrigues A., Loua K.M., Konate L., Sy N., Dia I., Awolola T.S., Muskavitch M.A. T. & Conway D.J., 2013.** Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics* 193: 1221–1231.
41. **OMS, 2019.** Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=69c55393_9 (consulté le 14 juin 2020).
42. **Opoku A.A., Ansa-Asare O.D. & Amoako J., 2007.** The occurrences and habitat characteristics of mosquitoes in Accra, Ghana. *West African Journal of Applied Ecology* 11: 99-107.
44. **Oyewole I.O., Momoh O., Anyasor G.N., Ogunnowo A. & Ibidapo C., 2009.** Physico-chemical characteristics of *Anopheles* breeding sites: impact on fecundity and progeny development. *African Journal of Environmental Science and Technology* 3: 447-452.
45. **Pagès F., Orlandi-Pradines E. & Corbel V., 2007.** Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies Infectieuses* 37: 153-161.
46. **Paterson H.E., 1964.** Direct evidence for the specific distinctness of forms A, B and C of the *Anopheles gambiae* complex. *Rivista di Malariologia* 43: 191-196.
47. **R Core Team, 2016.** A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

48. **Robert V., Awono-Ambene H.P. & Thioulouse J., 1998.** Ecology of larval Mosquitoes, with Special Reference to *Anopheles Arabiensis* (Diptera : Culicidae) in Market-Garden wells in Urban Dakar, Senegal. *Journal of Medical Entomology* 35: 948-955.
49. **Samb B., Konate L., Irving H., Riveron J.M., Dia I., Faye O. & Wondji C.S., 2016.** Investigating molecular basis of lambda-cyhalothrin resistance in an *Anopheles funestus* population from Senegal. *Parasites & Vectors* 9 (1): 449.
50. **Scott J.A., Brogdon W.G. & Collins F.H., 1993.** Identification of Single Specimens of the *Anopheles gambiae* Complex by the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 520–529.
51. **Soleimani-Ahmadi M., Vatandoost H., Hanafi-Bojd A.A., Zare M., Safari R., Mojahedi A. & Poorahmad-Garbandi F., 2013.** Environmental characteristics of anopheline mosquito larval habitats in a malaria endemic area in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6 (7): 510-515.
52. **Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly H.M., Maiga O., Sankaré M., Sow M., Di Deco M.A. & Coluzzi M., 1998.** The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511.

ANNEXE

Identification des espèces du complexe *An. gambiae* par PCR selon les méthodes de Scott *et al.*, (1993) et de Fanello *et al.*, (2002)

Amorces utilisées

Amorces	Séquences (3'-5')
UN	GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT
GB	CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT
ML	TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA
AR	AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA

Réactifs et quantités (dans un volume final de 12,5 µl)

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Tampon (avec du MgCl ₂)	10X	1X
dNTP	25mM	0,2mM
Amorce UN	10 pmoles	5 pmoles
Amorce AR	10 pmoles	5 pmoles
Amorce GB	10 pmoles	5 pmoles
Amorce ML	10 pmoles	5 pmoles
Taq Polymerase	5u/µl	0,25u
ADN		2 µl
Eau		QSP 12,5µl

Conditions de la PCR

- 1 cycle : 94°C pendant 2 min
- 30 cycles : 94°C pendant 15 s, 50°C pendant 15s, 72°C pendant 15s
- 1 cycle : 72°C pendant 10 min

Tailles des bandes attendues après migration

- An. gambiae* : 390 pb
- An. arabiensis* : 315 pb
- An. melas* : 464 pb

Digestion avec l'enzyme HhaI

Réactifs	Cc initiale	Cc finale
Tampon	10X	1X
Enzyme HhaI	10u/µl	0,25u

Conditions de la digestion

37°C pendant 4h

Taille des bandes obtenues après digestion et migration

- An. coluzzii* : 376 pb
- An. gambiae* : 110 et 257 pb
- An. arabiensis* : 292 pb