

Résistance d'*Anopheles labranchiae* au DDT au Maroc : identification des mécanismes et choix d'un insecticide de remplacement

C. Faraj,¹ E. Adlaoui,¹ C. Brengues,² D. Fontenille² et M. Lyagoubi¹

مقاومة الأنوفيلية المتفرعة للدد.د.ت في المغرب: التعرف على الآليات واختيار المبيدات الحشرية البديلة
شفيقة فراج، البشير العدلاوي، سيسيل برانكس، ديدبي فونتوني، محمد اليعقوبي

الخلاصة: أجريت هذه الدراسة للتعرف على مقاومة الأنوفيلية المتفرعة، وهي ناقلة الملاريا في المغرب، في ولايات القنيطرة، وخوررجة ولعراش والخميسات وسلا خلال عام 2005. وقد كانت الأنوفيلية المتفرعة حساسة للبروبوكسور والفينيتروثيون والبيرميثرين، ومقاومة لمختلف تركيزات الدد.د.ت. أما من الناحية الجينية، فلم يكن هناك تغير في الهدف المشترك الذي يستهدفه الدد.د.ت والبيريترونيديات، وهو قناة الصوديوم المعتمدة على الفولطاج. ويبدو أن المقاومة ناجمة عن آليات إزالة السمية الخاصة بالدد.د.ت. فلا مانع من حيث المبدأ، من إحلال مركبات البيريترونيديات محل الدد.د.ت في المغرب. ويمكن عند ذلك كشف المقاومة ومراقبتها باستخدام أدوات جزيئية موثوقة في مختبر الحشرات الطبية في المعهد الوطني للصحة.

RÉSUMÉ Une étude de la résistance d'*Anopheles labranchiae*, vecteur du paludisme au Maroc, a été réalisée au niveau des provinces de Kénitra, Khouribga, Larache, Khémisset et Salé au cours de l'année 2005. *An. labranchiae* est sensible au propoxur, au fénitrothion et à la perméthrine, et résistant à des degrés divers au DDT. L'étude génétique de cette résistance n'a pas révélé l'existence de modification de la cible commune au DDT et aux pyréthrinoïdes, qui est le canal sodium voltage dépendant. Cette résistance semble être due à des mécanismes métaboliques spécifiques au DDT. Elle ne devrait, en principe, constituer aucun obstacle à la substitution du DDT par les pyréthrinoïdes au Maroc. La résistance peut désormais être détectée et surveillée par des outils moléculaires plus fiables au niveau du Laboratoire d'Entomologie médicale (LEM) de l'Institut national d'Hygiène.

Resistance of *Anopheles labranchiae* to DDT in Morocco : identification of the mechanisms and choice of replacement insecticide

ABSTRACT A study of *Anopheles labranchiae* resistance in Morocco was conducted in the provinces of Kénitra, Khouribga, Larache, Khémisset and Salé during 2005. *An. labranchiae* was susceptible to propoxur, fenitrothion and permethrin and resistant to varying degrees to DDT. Genetically there was no change to the target site common to DDT and pyrethroids, the voltage gated sodium channel. The resistance seemed to be due to detoxification mechanisms specific to DDT. In principle, there should be no obstacle to the substitution of DDT by pyrethroids in Morocco. Resistance can then be detected and supervised by more reliable molecular tools in the Laboratory of Medical Entomology of the National Institute of Hygiene.

¹Laboratoire d'Entomologie médicale, Département de Parasitologie, Institut national d'Hygiène, Rabat (Maroc) (Correspondance à adresser à C. Faraj : chafikaf@gmail.com).

²Laboratoire de Lutte contre les Insectes nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier (France).

Reçu : 18/06/06 ; accepté : 27/09/06

Introduction

La lutte contre *An. labranchiae*, vecteur du paludisme au Maroc, repose essentiellement sur l'utilisation du DDT en aspersion intradomiciliaire comme adulticide et du téméphos comme larvicide. La dernière utilisation du DDT comme adulticide date de 2001 dans les foyers résiduels du Rif.

La sensibilité de l'espèce à ces insecticides est régulièrement surveillée. Les premiers tests de sensibilité au DDT réalisés en 1959 montrèrent une sensibilité normale de l'espèce à cet organochloré au Maroc [1]. À partir de 1971, les premiers cas de résistance furent observés [1, J. De Zulueta, C.D. Ramsdale, rapport inédit, 1973]. Depuis, des taux de résistance atteignant jusqu'à 30 % ont été observés dans différentes régions du pays, aussi bien dans des zones sous aspersion que dans des zones qui n'ont pas connu de traitement depuis des dizaines d'années [L.F. Delfini, G.R. Shidrawi, rapport inédit, 1989]. Actuellement, la stratégie du Programme de Lutte antipaludique est orientée vers d'autres issues basées sur l'aménagement de l'environnement, la lutte biologique et la recherche d'insecticides de remplacement au DDT [2]. Toutefois, il n'y a aucune information sur l'état de sensibilité d'*An. labranchiae* aux autres insecticides : organophosphorés, carbamates et pyréthrinoïdes. Les mécanismes impliqués dans la résistance d'*An. labranchiae* au DDT ne sont pas non plus encore identifiés. Il semble primordial, avant d'envisager l'utilisation d'autres insecticides, d'identifier, d'une part, les mécanismes mis en jeu dans la résistance d'*An. labranchiae* au DDT et d'autre part, de connaître la sensibilité de ce vecteur à ces autres produits. En fait, deux mécanismes impliqués dans la résistance des anophèles au DDT sont, jusqu'à maintenant, mis en évidence :

une résistance métabolique qui correspond à une dégradation de l'insecticide par des enzymes, glutathion S-transférases (GST), ou une modification de la cible, mutation du gène canal sodium voltage dépendant (*kdr*) [3]. Le GST est un mécanisme spécifique au DDT ; son implication n'entrave pas l'utilisation des pyréthrinoïdes comme insecticides de remplacement au DDT. Par contre, l'implication du gène *kdr* n'entraîne pas uniquement la résistance au DDT mais aussi à la majorité, sinon à la totalité des pyréthrinoïdes utilisés en santé publique [4,5]. En Turquie où des résistances multiples existent chez *An. sacharovi*, espèce très proche d'*An. labranchiae* puisqu'elles appartiennent au même complexe, le *kdr* a déjà été mis en évidence [6].

La présente étude a pour objectifs d'étudier l'état de sensibilité d'*An. labranchiae* aux différents insecticides utilisés en santé publique, d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance au DDT au Maroc et d'orienter le choix d'un insecticide de remplacement.

Méthodes

Zone d'étude

Les anophèles utilisés dans cette étude ont été prélevés dans des zones agricoles soumises à des traitements chimiques et où différents taux de résistance au DDT ont été enregistrés. Cinq provinces ont été ainsi retenues : Kénitra, Khémisset, Larache, Houribga et Salé (Figure 1). Avant d'être soumis aux tests de sensibilité, les anophèles, capturés par aspirateur à bouche dans des abris animaux, ont été identifiés morphologiquement (*An. maculipennis* s.l.) [7]. Les survivants aux tests ont été identifiés par amplification génique (PCR) [8].

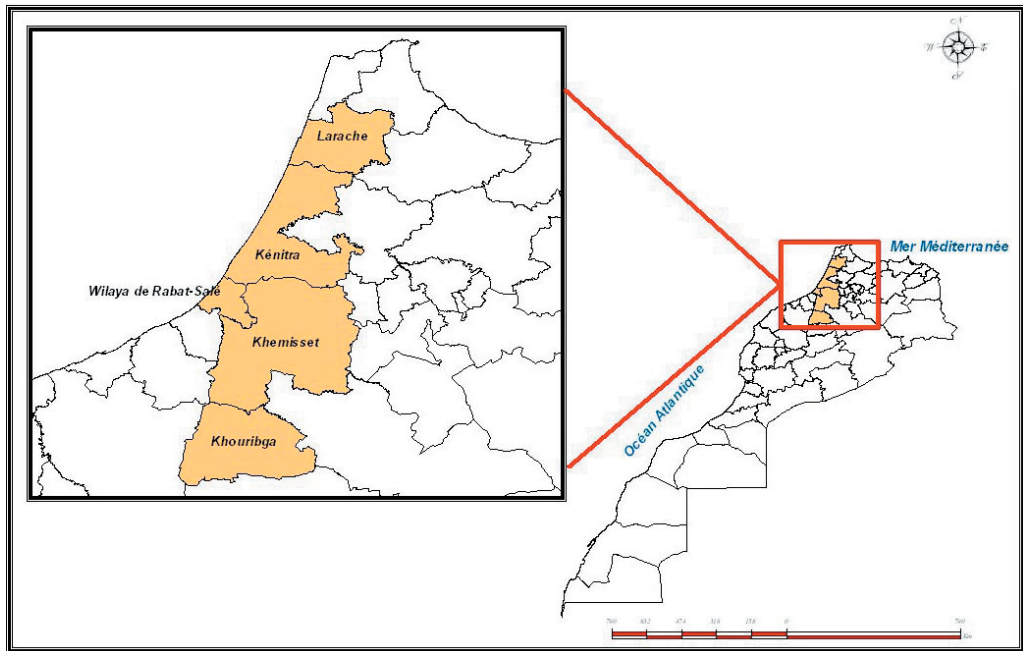


Figure 1 Provinces retenues pour l'étude de la résistance d'*An. labranchiae*

Tests biologiques

L'état de sensibilité d'*An. maculipennis* s.l. a été déterminé vis-à-vis de quatre insecticides : DDT 4 %, fénitrothion 1 %, propoxur 0,1 % et perméthrine 0,75 %. Les tests ont été pratiqués sur des femelles sauvages du complexe *An. maculipennis* selon la méthode normalisée par l'OMS [9]. Cette méthode consiste à exposer les moustiques à des papiers imprégnés d'insecticides à la concentration diagnostique. Les tests ont été réalisés sur des lots de 20 à 25 femelles gorgées dans des tubes OMS avec 3 à 4 répétitions par insecticide. Pour chaque test, deux tubes tapissés de papiers imprégnés uniquement d'huile minérale ont servi de témoins. Le temps d'exposition est de 60 mn. Après exposition, les moustiques sont maintenus sous observation pendant

24 heures à une température d'environ 25 °C et une humidité relative d'environ 70 % avant de noter la mortalité. Pour les tests à la perméthrine, le pourcentage de moustiques « knock-down » a été noté au cours de l'exposition. L'évolution de ce pourcentage a été analysée selon un modèle log probit afin de déterminer les temps de « knock-down », KDT_{50} et KDT_{90} . Tous les survivants aux doses discriminatoires ont été conservés à - 80 °C avant d'être soumis à des analyses moléculaires.

Identification moléculaire des espèces

L'identification moléculaire des spécimens *An. maculipennis* s.l. a été faite selon la technique décrite par Proft et al. [8]. Elle est basée sur l'amplification de la région

« Second Internal Transcribed Spacer » ou ITS2 et utilise, en combinaison, un primer universel et des primers spécifiques permettant de différencier six parmi les sept espèces du complexe *An. maculipennis* s.l. : *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon*, *An. messeae* et *An. sacharovi*.

Recherche de la mutation du gène *kdr*

Il n'existe pas encore à ce jour de test diagnostique permettant la mise en évidence d'une mutation de type *kdr* chez *An. labranchiae*, comme il en existe chez *An. gambiae* [3] ou *C. pipiens* [10]. La recherche d'une éventuelle mutation dans la zone codant pour le canal sodium voltage dépendant chez *An. labranchiae* se fait par séquençage, après amplification de cette zone. Cette recherche a été effectuée au Laboratoire de Lutte contre les Insectes nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier (technique non publiée). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences du canal sodium voltage dépendant d'*An. sacharovi* [6].

Résultats

Au niveau de chaque province, les tests ont été réalisés par ordre de priorité, en fonction de la densité d'adultes d'*An. labranchiae*, au DDT (4 %), à la perméthrine (0,75 %), au propoxur (0,1 %) et au fénitrothion (1 %). Les populations testées sont totalement sensibles au propoxur et à la perméthrine avec des KDT₅₀ et KDT₉₀ variant respectivement autour de 15 et 35 mn (Tableau 1). Les taux de résistance au DDT sont variables selon les provinces. Dans la province de Larache,

on enregistre des taux de résistance de 19 et 22 %, respectivement, pour les localités de Boucharen et Louamra. Dans la localité de Ouled Moussa, province de Kénitra, le taux de résistance au DDT est de 19 % alors que 5 % de cette même population a survécu au fénitrothion. Dans la province de Khouribga, localité de Béni Khlef, le taux de résistance au DDT est de 25 %. Dans la localité de Chougaga, province de Khémisset, 10 % de la population testée a survécu à la dose discriminatoire du DDT ; 2 % de cette même population a survécu à la dose discriminatoire du fénitrothion. Dans la localité de Ouled Bourzine, préfecture de Salé, la mortalité notée après l'exposition au DDT est de 85 %.

Les tailles des bandes de migration des produits d'amplification de la région ITS2 révélées sur gel d'agarose ont été comparées à celles du témoin du complexe *An. maculipennis* et du marqueur de taille (100-1000 pb). La taille des bandes obtenues est de 375 pb, similaire à celle du témoin *An. labranchiae*. *An. labranchiae* est donc la seule espèce du complexe *An. maculipennis* s.l. retrouvée parmi les spécimens survivants testés. Ces résultats concordent avec ce qui est déjà rapporté sur la composition du complexe *An. maculipennis* s.l. au Maroc [11].

Le séquençage des produits d'amplification chez les spécimens ayant survécu à l'exposition au DDT n'a pas révélé de différence au niveau du gène canal sodium voltage dépendant par rapport à des spécimens d'*An. sacharovi* sensibles. Il n'y a donc pas de mutation de type *kdr* chez les spécimens testés. Ces résultats donnent à penser que les mécanismes impliqués dans la résistance d'*An. labranchiae* au DDT sont vraisemblablement de nature biochimique.

Tableau 1 Résultats des tests de sensibilité d'*An. labranchiae* aux différents insecticides

Province	Localité	Insecticide	Nbre de femelles exposées	Mortalité (%)	Taux de résistance (%)	KDT ₅₀ (mn)	KDT ₉₀ (mn)
Larache	Louamra	DDT	78	78	22	14,47 (E.T. 0,14)	30,09 (E.T. 0,06)
		Perméthrine	59	100	0		
		Propoxur	60	100	0		
		Fénitrothion	60	95	5		
Kénitra	Ouled Moussa	DDT	81	81	19	16,07 (E.T. 0,17)	40,44 (E.T. 0,06)
		Perméthrine	65	100	0		
		Propoxur	78	100	0		
		Fénitrothion	80	95	5		
Khouribga	Béni Khlef	DDT	80	75	25	16,49 (E.T. 0,25)	39,34 (E.T. 0,1)
		Perméthrine	77	100	0		
Khémisset	Chougaga	DDT	80	90	10	12,30 (E.T. 0,59)	31,46 (E.T. 0,29)
		Perméthrine	80	100	0		
		Propoxur	76	100	0		
		Fénitrothion	60	98	2		
Salé	Ouled Bourzine	DDT	80	85	15	13,39 (E.T. 0,32)	29,59 (E.T. 0,15)
		Perméthrine	60	100	0		
		Propoxur	60	100	0		

E.T. : écart type
mn : minutes.

Discussion

D'après les résultats des tests biologiques réalisés au niveau des différentes zones étudiées, *An. labranchiae* est sensible à la perméthrine, au propoxur et au fénitrothion (Tableau 1). Il présente une résistance faible à modérée au DDT. Les taux de résistance au DDT varient de 10 à 25 % selon les régions. La souche de Khouribga semble être la plus résistante, celle de Salé la plus sensible. Cette résistance semble être maintenue malgré l'arrêt des traitements au DDT. Les premiers cas de résistance ont été détectés en 1971 dans les provinces de Kénitra, Khouribga et El Jadida [1], soit une dizaine d'années après les premières utilisations

du DDT en santé publique. Par la suite, plusieurs enquêtes entomologiques ont montré la présence de cette résistance dans d'autres régions. En 1973, des contacts de 2 et 4 heures avec des papiers imprégnés au DDT (4 %) n'ont entraîné respectivement que 83 % et 91 % de mortalité chez *An. labranchiae* dans le secteur de Louamra (province de Larache). Ce constat a incité De Zulueta et Ramsdale à s'inquiéter quant à une éventuelle progression et généralisation de la résistance au DDT, comme c'était le cas en Turquie. Dix ans plus tard, J.L. Clarke [rapport inédit] a obtenu des taux de mortalité similaires (87 % après une exposition de 2 heures)

dans la localité de Lyadiya (province de Kénitra). Des taux comparables ont été obtenus par Delfini en 1989 dans la province de Fès qui n'a pas été traitée au DDT depuis 1971 (77 % et 86 % respectivement après 1 et 2 heures de contact). Le même auteur a observé le même taux de résistance dans la province de Meknès (89 % de mortalité après 2 heures d'exposition). Nous-mêmes avons enregistré, dans le cadre du Programme national de Lutte antipaludique, des taux de résistance semblables au cours des 10 dernières années dans différentes provinces du pays.

Les derniers traitements au DDT en santé publique dans les provinces de Salé et Kénitra ont eu lieu il y a plus de 25 années, alors qu'ils ont été interdits en agriculture dans les années 1970. Au niveau des provinces de Larache, Khémisset et Khouribga, ceux-ci ont eu lieu il y a respectivement 17, 11 et 5 ans. Le maintien d'une faible résistance apparente après l'arrêt des aspersions laisse supposer l'existence d'une pression de sélection exercée par d'autres insecticides qui sont toujours en cours d'utilisation, tels que les pyréthrinoïdes largement utilisés en agriculture.

La résistance d'*An. labranthiae* aux pyréthrinoïdes, aux carbamates, aux organochlorés et aux organophosphorés est mal documentée au Maroc. La sensibilité aux organophosphorés n'est approchée qu'à travers les tests de sensibilité des larves au téméphos. Celles-ci sont, en fait, toujours sensibles à ce produit (données non publiées du Laboratoire d'Entomologie médicale - LEM) malgré son utilisation, dans le cadre du Programme national de Lutte antipaludique, comme seul insecticide dans la lutte antilarvaire depuis les années soixante-dix. Les résultats de notre étude concernant la sensibilité au fénitrothion à 1 % concordent avec ces données. Quant à la sensibilité aux pyréthrinoïdes, le seul test concernant la lambdacyhalothrine 0,1 %,

réalisé dans la province de Kénitra [2], montre une sensibilité normale de l'espèce à ce produit (98 % de mortalité après une heure de contact). Toutefois, il faut signaler que la dose de lambdacyhalothrine utilisée (0,1 %) est deux fois la dose diagnostique utilisée pour *An. gambiae* (0,05 %) [5]. Nos résultats actuels avec la perméthrine à 0,75 % peuvent être aussi discutés puisque cette dose n'a jamais été testée pour *An. labranthiae*. Chandre [5] a réévalué ces doses pour *An. gambiae* à 1 % pour la perméthrine et 0,05 % pour la lambdacyhalothrine. Idéalement, la dose diagnostique devrait être établie pour chaque espèce et chaque insecticide. Toutefois, en tenant compte de l'effet « knock-down » observé au cours de l'exposition des femelles à la perméthrine, et de la mortalité de 100 % après 24 heures, nous pensons pouvoir conclure à une sensibilité normale d'*An. labranthiae* aux pyréthrinoïdes. Les taux de KDT₅₀ et KDT₉₀ variaient respectivement autour de 15 et 35 mn. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souches sensibles d'*An. gambiae* homozygotes et hétérozygotes pour le gène *kdr* [5]. D'après le même auteur, la baisse de l'effet « knock-down » peut être considérée comme un indicateur précoce de l'apparition de la résistance car elle peut être significative avant même que l'on observe une baisse de mortalité. Celle-ci n'est en fait obtenue par les tests OMS que lorsque la population est constituée d'une proportion importante d'homozygotes pour le gène de résistance. Afin de confirmer la probable non-implication d'une mutation sur le gène *kdr*, nous avons recherché une éventuelle mutation de ce gène. Le test diagnostique du gène *kdr* permettrait l'identification de la mutation de ce gène chez les individus hétérozygotes, d'où une détection précoce de l'apparition de la résistance [5].

Le séquençage de la région du canal sodium voltage dépendant susceptible de présenter une mutation de type *kdr* et la

comparaison avec celle d'*An. sacharovi* sensible n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque mutation qui pourrait être impliquée dans la résistance au DDT observée chez *An. labranchiae*. Ces données indiquent que la baisse de sensibilité au DDT n'est pas due à une modification du canal sodium voltage dépendant, cible commune au DDT et aux pyréthriinoïdes.

Ces derniers constitueraient donc l'alternative idéale pour remplacer le DDT au Maroc tout en surveillant de près la sensibilité du vecteur vis-à-vis de ces produits. La détection précoce d'une mutation de ce gène contribuera sans aucun doute à la mise au point de stratégies de lutte permettant de mieux maîtriser ce phénomène de résistance. L'absence de mutation du gène *kdr* chez les individus qui ont survécu à la dose discriminatoire du DDT suppose l'implication de mécanismes de détoxication spécifiques à ce produit.

Conclusion

À travers cette étude nous avons confirmé, par l'utilisation du test OMS, la présence de la résistance d'*An. labranchiae* au DDT à des degrés divers et sa sensibilité à la perméthrine, au propoxur et au fénitrothion dans les provinces de Kénitra, Larache, Khouribga, Khémisset et Salé. Dans toutes ces provinces, les pyréthriinoïdes n'ont jamais été utilisés en santé publique tandis que le DDT l'a été depuis les années soixante et n'a pas été utilisé depuis 1980 dans les provinces de Salé et Kénitra et

depuis 1988, 1994, 2000 respectivement dans les provinces de Larache, Khémisset et Khouribga.

Les tests moléculaires ont montré l'absence de mutation du gène *kdr*. L'utilisation du DDT en santé publique pendant plus de 30 ans et celle des pyréthriinoïdes agricoles depuis plusieurs années n'ont apparemment jamais sélectionné la mutation *kdr* chez *An. labranchiae* au Maroc. Les pyréthriinoïdes resteraient, pour le moment, les insecticides de choix pour la substitution du DDT dans la lutte contre le paludisme. La surveillance de la résistance par de nouveaux outils moléculaires est recommandée.

Remerciements

Cette étude a reçu le soutien technique et financier du Bureau régional de l'OMS pour la Méditerranée orientale (EMRO), Division des Maladies transmissibles (DCD), et le Programme spécial UNICEF/PNUD/Banque mondiale/OMS de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR).

Nous tenons à remercier le programme EDEN, GOCE-2003-010284 qui a facilité le déroulement de ce travail. Cet article est référencé EDEN0024. Le contenu de cette publication est sous la seule responsabilité des auteurs et n'engage pas l'Union européenne. Nos vifs remerciements vont également à l'équipe du Laboratoire d'Entomologie médicale : Souad Ouahabi, Mohammed Elkohli, Elhousseine Lakraa et Mohammed Elrhazi pour leur précieuse aide technique sur le terrain et au laboratoire.

Références

1. Benmansour N *et al.* Étude de la sensibilité au DDT de *Anopheles maculipennis labranchiae* au Maroc de 1959 à 1971. *Annales Médico-Chirurgicales d'Avicenne*, 1972, III (5-6): 213–220.
2. Faraj C *et al.* Étude de l'efficacité de la lambda-cyhalothrine, pyrèthroïde de synthèse, dans la lutte contre *Anopheles labranchiae* en aspersion intradomestique. *Bulletin épidémiologique*, 1996, 25:2–8.
3. Martinez-Torres DF *et al.* Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect molecular biology*, 1998, 7:179–84.
4. Darriet F *et al.* *Présence et évolution de la résistance aux pyrèthroïdes et au DDT chez deux populations d'Anopheles gambiae* s.s. d'Afrique de l'Ouest. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1997. (WHO/CTD/VBC/97.1001 et WHO/MAL/97.1081)
5. Chandre F. *Résistance d'Anopheles gambiae Giles et de Culex pipiens quinquefasciatus Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles* [Thèse]. Paris, Université Paris XII Val-de-Marne, 1998.
6. Luleyap HU *et al.* Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. *Journal of medical entomology*, 2002, 39(6):870–4.
7. Brunhes J *et al.* *Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne*. Logiciel d'identification et d'enseignement. Montpellier/Tunis, Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Institut Pasteur de Tunis (IPT), 2000 (CD-Rom Collection « Didactiques »).
8. Proft J *et al.* Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction assay. *Parasitology research*, 1999, 85:837–43.
9. *Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle*. Dix-septième rapport du Comité OMS d'experts des Insecticides. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1970 (Série de Rapports techniques n° 443).
10. Martinez-Torres DF *et al.* Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pesticide Science*, 1999, 55:1012–20.
11. Faraj C *et al.* Note sur le complexe *Anopheles maculipennis* au Maroc. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, 2004, 97(4):293–4.