



UNIVERSITÉ MOHAMMED V - AGDAL  
FACULTÉ DES SCIENCES  
Rabat



N° d'ordre : 2668

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée par

**LABOUDI Majda**

**Etude d'*Anopheles labranchiae* (Diptera, Culicidae), vecteur du  
paludisme, au nord du Maroc:**

**Caractérisation moléculaire et approche écologique**

Discipline: Biologie.

Spécialité : Parasitologie et Entomologie Médical  
U.F.R : Biodiversité et aquaculture

Soutenance: 18 septembre 2013 à 15 heures

Devant le jury :

**Président :**

Pr YAHYAOUI Ahmed                      Professeur à la Faculté des Sciences, Rabat

**Examineurs :**

SADAK Abderrahim                      Professeur à la Faculté des Sciences, Rabat

FARAJ Chafika                              Ingénieur en chef, Institut National d'Hygiène, Rabat

JAZIRI Hassan                              Professeur à la Faculté des Sciences, Rabat

RHAJAOUI Mohamed                      Docteur en Biologie, Institut National d'Hygiène, Rabat

BELGHYTI Driss                              Professeur à la Faculté des Sciences, Kenitra

## DEDICACES

*A mes très chers parents*

*Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.*

*A ma sœur*

*A mes frères*

*A ma famille*

*A mes amis*

## AVANT PROPOS

Ce thème de recherche sur le complexe *Anopheles maculipennis* au Nord du Maroc présente un intérêt aussi bien sur le plan bio-écologique et épidémiologique que sur le plan biomédical et la lutte contre le paludisme. Les travaux présentés dans ce document ont été menés au laboratoire d'Entomologie Médical du département de parasitologie et au laboratoire de biologie moléculaire au sein de l'Institut National d'Hygiène de Rabat, au laboratoire de Biologie moléculaire au Centre National de Recherche Scientifique à Rabat, au laboratoire de Systématique Moléculaire au Natural History Museum à Londres au Grande Bretagne et au laboratoire de biologie moléculaire du Département des Maladies Infectieuses, Parasitaires et Auto-immunes à l'Institut Supérieur de Santé à Rome Italie. Ces travaux ont été soutenus financièrement par le projet de recherche européen EDEN.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par le Prof. SADAK Abderrahim, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat (UFR : Biodiversité et Aquaculture, SV01/01) et Mme FARAJ Chafika, Entomologiste médical et chef du laboratoire d'Entomologie Médicale à l'Institut National d'Hygiène de Rabat.

J'exprime aussi mes remerciements pour **Pr SADAK Abderrahim**, Professeur de parasitologie à la Faculté des Sciences de Rabat et Directeur de thèse, de m'avoir accepté parmi ses étudiants, de m'avoir guidé avec rigueur, passion et confiance vers le chemin de la thèse. Merci pour le temps que vous m'avez consacré pour redonner un peu de rigueur à ma plume et en général pour votre disponibilité et votre générosité. Votre intérêt et votre disponibilité ont permis de mener à bien cette thèse.

Je tien à remercier **Mme FARAJ Chafika**, Ingénieur Chef et responsable du Laboratoire d'Entomologie Médical à l'Institut National d'Hygiène de Rabat, pour m'avoir proposé de travailler sur le complexe *Anopheles maculipennis* et de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce travail de thèse. Merci pour la qualité de son encadrement, la pertinence de ses remarques, sa simplicité et sa convivialité.

Mes remerciements les plus respectueux pour **Pr YAHYAOUI Ahmed**, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, chef de l'UFR et Président du Jury, qui a accepté mon inscription au Doctorat national dans le cadre de l'UFR qu'il dirige à l'Université Mohamed V, Faculté des Sciences de Rabat

Je remercie **Dr JAZIRI Hassan**, Professeur à la Faculté des sciences de Rabat et Directeur de l'Ecole Normal Supérieure à Rabat pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de le juger et d'accepter d'être examinateur du jury de thèse.

Je remercie **Dr RHAJAOUI Mohamed**, Directeur de l'Institut National d'Hygiène à Rabat pour ses encouragements pour ce travail. Il a suivi avec intérêt le déroulement de mes travaux durant ses années de travail au sein du département. Il m'a fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineur, qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Je remercie **Dr Belghyti Driss**, Professeur à la Faculté des sciences de Kénitra d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail.

*Je remercie* Mr **M. DIOUANE**, Major du département de parasitologie pour son aide et son soutien au cours de mes années d'étude.

*Je remercie également* Mr **E. LAKRAA**, Technicien au laboratoire d'entomologie médicale du département de parasitologie pour sa contribution et sa motivation sans faille sur le terrain.

*Un grand merci,*

- A l'équipe du laboratoire d'Entomologie médical du département de parasitologie, **S. OUAHABI, B. ADLAOUI, S. EL RHAZI, M. KOHLI et N. SAAF.**
- Pour Dr **Daniella BOCCOLONI**, pour son accueil chaleureux et pour son assistance à la réalisation de la PCR au Département des Maladies Infectieuses, Parasitaires et Auto-immunes à l'Institut Supérieur de Santé à Rome Italie
- Pour M<sup>me</sup> **Sanae LMRABET** pour son assistance à la réalisation de la PCR au laboratoire de biologie moléculaire à l'Institut National d'Hygiène de Rabat.
- A Dr **Yvonne LINTONN**, Docteur en Biologie qui a partagé les efforts nécessaires au séquençage du complexe *Anopheles maculipennis* et l'analyse des données.
- Pour Dr **Mustapha AZELMAT**, Statisticien à la direction de la population pour son aide précieuse concernant l'analyse statistique.
- Pour Pr **TATOU**, professeur à l'Institut Scientifique de Rabat pour l'identification des plantes
- A tous mes collègues et amis, **B. ELMANSOURI, N. ELMIMOUNI, A. LAHRAOUI, M. HADAOUI, M. MOUMNI, F. OUAHDI, L. OUAFAQ, B ZAIM, F. AMARIR, I. BELBACHA, N. BOUKLATA, R. SABOUNI et Y. BOUCHOUCHA** pour leurs soutiens pendant ma période thèse.
- A tous mes amis qui me sont chers, **L. TAMSAMANI, Z. BOUJDIA, N. SLIMANI, T. RAHALI et T. LASFER**, pour l'amitié qui nous a liées pendant la période des études.

*Une mention particulière pour :*

**M<sup>me</sup> Sanaa TOK**, collègue et copine de chemin pour sa sympathie et son encouragement, trouver ici ma gratitude pour son soutien durant toute la période d'étude et pour son amitié très précieuse.

*Enfin*, j'adresse une pensée reconnaissante à ma famille pour m'avoir encouragée tout au long de mes études et en particulier à mes parents pour leur réconfort au cours de ces derniers mois de travail.

## RÉSUMÉ

---

---

Les anophèles sont les seuls vecteurs connus du paludisme. Au Maroc, cette infection constituait un réel problème de santé publique. Aujourd'hui, bien que la maladie ait été éliminée, la région Nord est constituée de véritables gîtes actifs pour le complexe *Anopheles maculipennis*. Il regroupe 12 espèces jumelles, que l'on ne peut différencier qu'à l'aide de la biologie moléculaire. En effet, les travaux menés sur le groupe *Anopheles maculipennis* restent fragmentaires et limités à certaines zones. Afin d'améliorer et d'actualiser les connaissances sur la composition de ce complexe et de son écologie, nous avons mené une série d'échantillonnage, dans différents biotopes et gîtes larvaires dans le nord ouest du Maroc. Les résultats de l'identification d'espèce, par PCR multiplexe, menée sur 407 anophèles du complexe *maculipennis* confirment la présence de la seule espèce *An. labranchiae* représentant le complexe. Par ailleurs, le séquençage de l'ADN mitochondriale de 89 spécimens d'*An. labranchiae*, réalisé pour la première fois au Maroc, a été comparé à celui des populations de l'Algérie ; les résultats prouvent la présence des mêmes caractères génétiques au sein des deux pays. Aucune différence génétique n'a été détectée entre les populations récoltées.

En parallèle, nous avons effectué une étude transversale dans 25 localités de la province de Larache. 52% des 54 habitats aquatiques investis se sont avérés être des gîtes productifs de larves d'anophèles. *An. labranchiae* étant l'espèce prédominante avec une fréquence de 76 %. L'analyse statistique a montré que les facteurs influençant l'abondance des larves d'*An. labranchiae* sont la turbidité, la profondeur, le pH du milieu et la présence des rizières.

D'un autre côté, l'élevage d'*An. labranchiae* en insectarium a permis de déterminer les paramètres biologiques de la première génération: 70 % pour le taux d'éclosion, 54 % pour le taux d'émergence, 46 % pour le taux de nymphose, 25 % pour le rendement pré-imaginal et 46 % pour le taux d'inhibition de l'émergence. Le sex-ratio de la première génération est de 0,50. Bien qu'il soit difficile d'entretenir cet anophèle marocain, l'obtention de la 1<sup>ère</sup> génération F1 ne peut être que prometteur pour continuer nos expériences dans cet axe étude. Les résultats de ce travail constituent une base de données intéressante pour prévoir une lutte antivectorielle très efficace.

**Mots-clés:** Paludisme, le complexe *Anopheles maculipennis*, PCR multiplex, séquençage d'ADN mitochondrial, écologie d'*An. labranchiae*, élevage d'*An. labranchiae*.

## ABSTRACT

---

---

*Anopheles* are the only known Malaria vectors. In Morocco, this infection was a real public health problem. Currently, although the disease has been eliminated, the northern region represents a potential breeding site for *Anopheles maculipennis* complex which includes 12 sibling species that are only distinguished by means of molecular biology.

Indeed, studies on the *Anopheles maculipennis* group remain scarce and limited to certain areas. In order to improve and update the knowledge on the composition of the complex and its ecology, we have conducted a series of sampling in different habitats and breeding in the north west of Morocco. The species identification done by multiplex PCR and conducted on 407 anopheles of the *maculipennis* complex confirms the presence of one species: *An. labranchiae*. Moreover, the sequencing of mitochondrial DNA of 89 specimens of *An. labranchiae*, performed for the first time in Morocco, has been compared to Algerian's populations of *An. labranchiae*. Results show the presence of the same species in the two countries. No genetic differences were detected between the populations of *labranchiae*.

In parallel, cross-sectional larval surveys were carried out in 25 localities belonging to Larache province. 52% of the 54 aquatic habitats sampled are sources of anopheles larvae, *An. labranchiae* being the predominant one with a frequency of 76%. Statistical analysis showed that the factors influencing the abundance of *An. labranchiae* larvae are the turbidity, the depth, the pH and the presence of rice field. On the other hand, we managed to establish a local colony of *An. labranchiae* in insectariums. The observations on the productivity of the colony of the first generation showed that the hatching rate is 70%, the emergence rate is 54%, the pupal rate is 46%, the preimaginal performance is 25% and the emergence inhibition rate is 46%. The sex ratio is equal to 0.50. Although it is difficult to establish this Moroccan *Anopheles* in insectariums, the survival of the first generation F1 is promising and encourages us to continue experiments in this way. The results of this work are an interesting database for an effective vector control.

**Key words:** *Malaria, Anopheles maculipennis complex, multiplex PCR, sequencing of ADN mitochondrial, ecology of An. labranchiae, breeding of An. labranchiae.*

## LISTE DES PUBLICATIONS

---

### *PUBLICATIONS ECRITES*

#### Article 1 :

- **DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*.** Majda Laboudi, Chafika Faraj, Abderrahim Sadak, Zoubir Harrat, Said Chawki Boubidi, Ralph. E. Harbach, Rajae El Aouad, Yvonne-Marie Linton. *Acta Tropica*, Volume 118, Issue 1, 2011, P: 6-1.

#### Article 2 :

- **Some environmental factors associated with *Anopheles labranchiae* larval distribution during summer 2009, in Larache province, Morocco.** Majda Laboudi, Chafika Faraj, Abderrahim Sadak, Mustapha Azelmate, Mohamed Rhajaoui, Rajae El-Aouad. *African Entomology*, 2012. Vol. 20(2).

#### Article 3:

- **Molecular characterization of *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Northern Morocco.** Majda Laboudi, Abderrahim Sadak, Souad Ouahabi, Daniela Boccolini, Chafika Faraj. *Journal Faunistic Entomology* (accepté, sous press 2013).

### *PUBLICATION ORALE*

- **Bionomics and Vector competence of *Anopheles* in the North of Morocco : Evaluation of the risk of re-emergence of Malaria disease in Morocco,** M. LABOUDI, C. FARAJ, A. SADAK, R. EL AOUAD. Communication oral, Brno 2008, *PhD EDEN ANNUAL MEETING* 14-15 January 2008, Brno, Czech Republic

### *PUBLICATIONS AFFICHEES*

- **Etude des Anophèles au nord du Maroc :** M. LABOUDI, C. FARAJ, A. SADAK, R. EL AOUAD, *Congrès de la Société Française de Parasitologie*, du 13 au 14 Décembre 2007, Nice. France
- **Malaria disease in Morocco: History and Actual situation:** M. LABOUDI, C. FARAJ, A. SADAK, M. RHAJAOUI, R. EL AOUAD. *EDEN ANNUAL MEETING* 14-18 January 2008, Brno , Czech Republic
- **Spatial distribution and characterization habitat of *Anopheles* larvae in Larache province, Northwest of Morocco.** M. LABOUDI, C. FARAJ, A. SADAK, R. EL AOUAD, 5<sup>th</sup> International SOVE Congress, Vectors without Borders, 11-16 October 2009, Antalya, Turquie
- **The status of *Anopheles labranchiae* in northern Africa based on DNA Barcodes.** M. LABOUDI, C. FARAJ, A. SADAK, Z. HARRAT, S. CHAWKI, BOUBIDI, R.E. HARBACH, R.EL AOUAD & Yvonne-Marie Linton. International Conference EDEN 2010, 10-12th May 2010, Montpellier, France

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>An :</b>	<i>Anopheles</i>
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNr</b>	ADN ribosomiale
<b>ADNmit</b>	ADN mitochondriale
<b>AFMC :</b>	Analyse Factoriel Multiple des Correspondances
<b>dNTP :</b>	Desoxynucleotide triphosphate,
<b>INH :</b>	Institut National d'Hygiène
<b>P :</b>	<i>Plasmodium</i>
<b>pb :</b>	Paire de base
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RGPH :</b>	Recensement Général de la Population et de l'Habitat
<b>TBE :</b>	Tampon Tris, Borate, EDTA

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Paludisme dans la monde .....	4
<b>Figure 2:</b> Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	8
<b>Figure 3:</b> Anophèle vecteur du paludisme : <i>An. labranchiae</i> .....	9
<b>Figure 4:</b> Classification des anophèles d'après Harbach ,2004 .....	10
<b>Figure 5:</b> Particularités morphologiques des deux sous familles Anophelinae et culicinae .....	11
<b>Figure 6:</b> Cycle de vie d'un anophelinae d'après Knelle 1991 .....	12
<b>Figure 7:</b> Schéma d'une nymphe d'anophèle .....	13
<b>Figure 8:</b> Principales parties d'un adulte d' <i>Anopheles</i> d'après Holstein, 1949 .....	15
<b>Figure 9:</b> Cartes de distribution des principaux anophèles du Maroc .....	18
<b>Figure 10:</b> L'anophélisme en Algérie .....	19
<b>Figure 11:</b> Distribution géographique d' <i>An. labranchiae</i> , <i>An. atroparvus</i> , <i>An messae</i> et <i>An. sacharovi</i> ... ..	28
<b>Figure 12:</b> Distribution géographique d' <i>An. melano</i> , <i>An. beklemishevi</i> , <i>An. lewisi</i> , <i>An martinus</i> et <i>An. maculipennis ss</i> .....	30
<b>Figure 13:</b> Schéma des étapes d'amplification par PCR .....	34
<b>Figure 14:</b> les sites d'études au nord du Maroc .....	39
<b>Figure 15:</b> Photos de différents types gîtes larvaires dans les régions d'études .....	42
<b>Figure 16:</b> Le site d'étude en Algérie .....	43
<b>Figure 17:</b> Régions d'étude avec les sites échantillonnés dans la province de Larache .....	44
<b>Figure 18:</b> Matériels de collecte des larves .....	46
<b>Figure 19:</b> Les gites larvaires des différents secteurs de la région de Larache .....	48
<b>Figure 20:</b> Insectarium du laboratoire d'Entomologie Médicale à l'Institut National d'Hygiène de Rabat .....	59
<b>Figure 21:</b> L'alignement de la séquence d'ADNmt COI (658 pb) pour 89 <i>An. labranchiae</i> .....	67
<b>Figure 22:</b> L'arbre Neighbour-Joining .....	70
<b>Figure 23:</b> Exemple du résultat de la PCR multiplex .....	76
<b>Figure 24:</b> Approche graphique de l'AFCM des paramètres physicochimiques et la densité des larves selon le plan F1et F2.....	79
<b>Figure 25:</b> Distribution de l'habitat aquatique avec la densité des espèces récoltées sur le plan F1x F2..	80

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Les espèces anophéliennes signalées au Maroc .....	17
<b>Tableau 2:</b> Les principaux anophèles impliqués dans la transmission des plasmodies humaines .....	20
<b>Tableau 3:</b> Régions d'études et leurs coordonnées .....	42
<b>Tableau 4:</b> Amorces utilisés pour l'amplification des ITS1 de l'ADNr du complexe <i>Anopheles maculipennis</i> .....	50
<b>Tableau 5:</b> Réaction d'amplification d'ADNr pour les anophèles adultes .....	51
<b>Tableau 6:</b> Réaction d'amplification d'ADNr pour les larves d'anophèles .....	51
<b>Tableau 7:</b> Programme d'amplification D'ADNmt pour les anophèles adultes .....	52
<b>Tableau 8:</b> Programme d'amplification d'ADNmt pour les larves d'anophèles .....	52
<b>Tableau 9:</b> Réaction d'amplification d'ADNmt .....	54
<b>Tableau 10:</b> Programme d'amplification de l'ADNmt .....	55
<b>Tableau 11:</b> limites des différentes composantes quantitatives et qualitatives respectives aux différentes variables étudiées .....	58
<b>Tableau 12:</b> Collection des anophèles dans 8 provinces au nord du Maroc .....	65
<b>Tableau 13:</b> Détails de 89 espèces d' <i>An. labranchiae</i> séquencées collectées au Maroc et l'Algérie .....	66
<b>Tableau 14:</b> Tableau comparatif de la séquence du COI de la population d' <i>An. labranchiae</i> au nord du Maroc et l'Algérie .....	68
<b>Tableau 15:</b> Le nombre total des larves d'anophèles du troisième et quatrième stade collectés dans 10 secteurs de la province de Larache .....	75
<b>Tableau 16:</b> Matrice de corrélation entre les variables étudiées .....	77
<b>Tableau 17:</b> Taux d'éclosion observés expérimentalement chez <i>An. labranchiae</i> au laboratoire .....	86
<b>Tableau 18:</b> Sex-ratio de la génération F1 pour <i>An. labranchiae</i> élevé en insectarium .....	87
<b>Tableau 19:</b> Evolution des larves d' <i>An labranchiae</i> obtenue par élevage individuel .....	87
<b>Tableau 20:</b> Effet du type de nourriture sur le durée du développement préimaginal d' <i>An labranchiae</i> au laboratoire .....	88

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	I
----------------------------	---

### PREMIERE PARTIE REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LE PALUDISME.....	3
1-1 GENERALITES ET HISTORIQUE.....	3
1-1-1 Le paludisme dans le monde.....	3
1-1-2 Le paludisme au Maroc .....	5
I-2 L'AGENT PATHOGENE : LE <i>PLASMODIUM</i> .....	6
I-2-1 Taxonomie .....	7
I-2-2 Cycle des plasmodiums .....	7
II- L'ANOPHELE : VECTEUR DU PALUDISME.....	9
II-1 TAXONOMIE.....	10
II-2 CYCLE BIOLOGIQUE ET MORPHOLOGIE .....	12
II-2-1 Phase aquatique .....	13
II-2-2 Phase aérienne .....	14
II-3 ETHOLOGIE ET ECOLOGIE.....	16
III- LES ANOPHÈLES DU MAROC ET DE L'ALGÉRIE .....	17
III-1 LES ANOPHELES DU MAROC .....	17
III-2 LES ANOPHELES DE L'ALGERIE.....	19
IV- PRINCIPAUX GROUPES D'ESPÈCES ANOPHÉLIENNES VECTRICES DANS LE MONDE .....	20
V- LE GROUPE PALÉARCTIQUE D'ANOPHELES MACULIPENNIS.....	21
V-1 HISTORIQUE ET TAXONOMIE .....	21
V-2 IMPORTANCE MEDICALE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE .....	27
VI- METHODES D'IDENTIFICATION DES ESPECES ANOPHELIENNES.....	32
VI- 1 METHODES MORPHOLOGIQUES .....	32
VI -2 METHODES CYTOGENETIQUES .....	32
VI- 3 METHODES ISO-ENZYMATIQUES .....	32
VI -4 METHODES MOLECULAIRES .....	33
VI-4-1 Principe de la PCR .....	34
VI-4-2 Différentes Méthodes d'identification moléculaires.....	35

## DEUXIÈME PARTIE

### PARTIE PRATIQUE

#### CHAPITRE I.

#### *PRÉSENTATION DU MILIEU, MATÉRIELS ET MÉTHODES*

I- PRÉSENTATION DES RÉGIONS D'ÉTUDE .....	38
I- 1 CARACTERISATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS .....	38
I-1-1 REGIONS D'ETUDES AU MAROC.....	38
I-1-2 REGIONS D'ETUDE EN ALGERIE.....	43
I- 2 CARACTERISATION SPATIAL D'ANOPHELES LABRANCHIAE DANS LA REGION DE LARACHE .....	44
II- ENQUÊTE ENTOMOLOGIQUE.....	45
II- 1 TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGE DES ANOPHELES.....	45
II-1-1 Echantillonnage des adultes .....	45
II-1-2 Echantillonnage des larves .....	45
II-2 CONDITIONNEMENT DES ANOPHELES.....	46
II-2-1 Conditionnement des moustiques adultes .....	46
II-2-2 Conditionnement des larves .....	46
II-3 IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES ECHANTILLONS.....	47
II-4 MESURE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES GITES DANS LA REGION DE LARACHE.....	47
III- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE MACULIPENNIS PAR LA PCR MULTIPLEX.....	49
III-1 ORIGINE DES ECHANTILLONS .....	49
III- 2 EXTRACTION DE L'ADN.....	49
III-3 AMPLIFICATION DE L'ADN.....	49
III-3-1 Choix des amorces .....	49
III-3-2 Préparation du milieu réactionnel .....	50
III-3-3 Programme d'amplification de l'ADN.....	51
III-4 ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE.....	52
IV- SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIALE D'AN.LABRANCHIAE.....	53
IV - 1 ORIGINE DES ECHANTILLONS .....	53
IV-2 EXTRACTION DE L'ADN .....	53
IV-3 AMPLIFICATION DE L'ADN .....	53
IV-3-1 Préparation du milieu réactionnel .....	53
IV-3-2 Programme d'amplification .....	54
IV-4 ELECTROPHORESE.....	54
IV-5 PURIFICATION .....	54
IV- 6 SEQUENÇAGE .....	54
IV-7 ANALYSE DES DONNEES .....	55
IV-7-1 Alignement des séquences nucléotidiques.....	55
IV-7-2 Reconstruction de la phylogénie des haplotypes .....	55
V. CARACTERISATION SPATIALE DES HABITATS AQUATIQUES DES LARVES D'ANOPHELES DANS LA REGION DE LARACHE.....	56
V-1- EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME AUTOCHTONE DANS LA REGION DE LARACHE .....	56
V-2 ANALYSE STATISTIQUE .....	56
VI- TECHNIQUE D'ELEVAGE.....	58
VI-1 INSECTARIUM.....	58
VI-2 ELEVAGE DE GROUPE.....	59
VI- 3 ELEVAGE INDIVIDUEL .....	60
VI- 4 EXPLOITATION DES RÉSULTATS .....	61

## RESULTATS & DISCUSSION

### CHAPITRE II:

#### CARACTERISATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS

I-PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS .....	62
II- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS PAR LA PCR MULTIPLEX.....	65
III- SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIALE DE L'AN. LABRANCHIAE.....	66
IV- DISCUSSION.....	71
IV-1 PCR MULTIPLEX .....	71
IV-2 SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....	71

### CHAPITRE III:

#### APPROCHE ECOLOGIQUE D'ANOPHELES LABRANCHIAE AU NORD DU MAROC : REGION DE LARACHE

I-INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	74
II- PROPORTION DES LARVES D'ANOPHELES.....	75
III- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS.....	76
IV- ANALYSE MULTIVARIEES.....	76
IV-1 CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES .....	76
IV-2 CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX AVEC LA DENSITE DE LARVES D'ANOPHELES .....	78
IV-3 DISTRIBUTION SPATIALE DES LARVES D'ANOPHELES.....	78
V- DISCUSSION.....	81
V-1 LES ANOPHELES RECOLTES .....	81
V-2 CORRELATIONS ENTRE LES PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES ET LA DENSITE DES ANOPHELES .....	82
V-3 DISTRIBUTION SPATIALE .....	83
VI- CONCLUSION.....	84

### CHAPITRE VI:

#### ELEVAGE D'ANOPHELES LABRANCHIAE

I-INTRODUCTION.....	85
II- DEVELOPPEMENT PRE-IMAGINAL.....	85
II-1 ELEVAGE DE GROUPE.....	85
II-2 ELEVAGE INDIVIDUEL .....	87
II-3 EFFET DE DEUX TYPES DE NOURRITURE SUR LA DUREE DU CYCLE DE DEVELOPPEMENT.....	87
III- DISCUSSION.....	88
IV- CONCLUSION.....	90
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	93

ANNEXES

RESUME

# INTRODUCTION GENERALE

---

**INTRODUCTION GENERALE**

---

Plus d'un siècle s'est écoulé depuis la découverte du parasite responsable du paludisme par Alphonse LAVERAN en 1880, de son agent causal par Ronald ROSS (1897) et du rôle vecteur de l'anophèle dans sa transmission, le paludisme reste l'une des pathologies les plus infectieuses et l'un des problèmes majeurs de santé au niveau mondial. En effet, près de 50% de la population mondiale vit dans les zones à risque et le nombre des décès dû au paludisme est estimé à 655 000 pour l'année 2010 dont 91% en Afrique et dont 86% sont de enfants en bas âge (OMS, 2011).

L'agent responsable du paludisme appartient au genre *Plasmodium* qui comprend 5 espèces: *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. vivax* (Grassi, 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. ovale* (Stephens, 1922) et *P. knowlesi* (Chin *et al.*, 1965). La transmission de ces 5 espèces à l'homme se fait exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles* qui comprend 484 espèces dont seulement une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme (Harbach, 2004). La plupart des espèces vectrices appartiennent à des complexes d'espèces isomorphes dont l'identification et la différenciation est difficile, voire impossible (Manguin *et al.*, 1999). Par contre, ces espèces présentent des différences quant à leur pouvoir à transmettre le paludisme, leurs caractéristiques biologiques, écologiques ainsi que leurs niveaux de sensibilité aux insecticides. L'identification morphologique, moléculaire et la connaissance des comportements des espèces d'anophèles rencontrées dans une zone donnée sont essentielles pour la mise en place des programmes de lutte antivectorielle sélectifs, appropriés et efficaces.

Au Maroc, *An. labranchiae*, principal vecteur du paludisme, appartient au complexe *maculipennis*. Les problèmes d'identification de ce complexe ont fait l'objet de nombreux travaux et études entomologiques (Bates et Hakett, 1939 ; Bates, 1940 ; Grjerbine *et al.*, 1976 ; White, 1978). Ces études ont révélées les difficultés et les contraintes rencontrées pour la différenciation entre les espèces de ce complexe en se basant uniquement sur des critères d'ordre morphologique.

Pour pallier à cette problématique, des études génétiques et moléculaires ont été entreprises depuis les années 1990 en utilisant des techniques analytiques sophistiquées en l'occurrence la PCR. Ces études ont été réalisées en Europe et ailleurs dans le monde et ont effectivement permit la diférenciation entre les différentes espèces du complexe. Au Maroc, bien que des études de séquençage de l'ADN ribosomiale ont été réalisées (Faraj *et al.*, 2004), aucune étude de séquençage de l'ADN mitochondriale n'a été entreprise jusqu'à présent vu le

coût élevé des réactifs et de l'appareillage utilisé ainsi que la nécessité de former des ressources humaines hautement qualifiées. Ainsi, de nombreuses questions restent posées quant à la similarité génétique d'*An. labranchiae* au sein des populations d'anophèles du groupe *maculipennis* vivant dans l'aire géographique de l'Afrique du nord notamment le Maroc et l'Algérie.

En plus de la caractérisation et l'identification précise des espèces vectrices du plasmodium, d'autres connaissances scientifiques sont nécessaires pour lutter contre les vecteurs du paludisme notamment la bio écologie des espèces cibles (Pages *et al.*, 2007).

En effet, la répartition géographique et l'évolution du paludisme dépend en grande partie des facteurs environnementaux conditionnant la présence du vecteur et la méconnaissance de la biologie et l'écologie du vecteur a été sans doute à la base des échecs enregistrés dans l'éradication du paludisme en Afrique (Chauvet *et al.*, 1969). Au Maroc, bien que des études ont été réalisées sur l'écologie du vecteur du paludisme avec un suivi spatiotemporel de ses larves, les études sur la caractérisation spatiale de ces dernières, et la détermination des principaux facteurs qui peuvent influencer leur densité restent fragmentaires. Ces études sont devenues ainsi nécessaires dans une perspective de contrôler les populations des vecteurs dans une région connue par son passé épidémiologique en paludisme.

L'objectif principal de notre étude de contribuer à l'amélioration des connaissances sur le complexe *Anopheles maculipennis* et les espèces qui le composent au nord du Maroc.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- 1- Etudier la composition spécifique du complexe maculipennis dans la région nord du Maroc;
- 2- Caractériser génétiquement, sur la base de l'ADN mitochondriale, les populations d'*Anopheles labranchiae* récoltées au nord du Maroc et les comparer à celles issues d'autres pays méditerranéens notamment l'Algérie ;
- 3- Caractériser les gîtes de reproduction d'*An. labranchiae* dans la province de Larache au nord du Maroc et déterminer les facteurs environnementaux influençant la distribution et l'abondance des populations larvaires
- 4- Déterminer, sous les conditions de laboratoire, les principaux paramètres biologiques relatifs au cycle pré-imaginal d'*An. labranchiae*.

PREMIERE PARTIE :  
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### I- LE PALUDISME

#### I-1 Généralités et historique

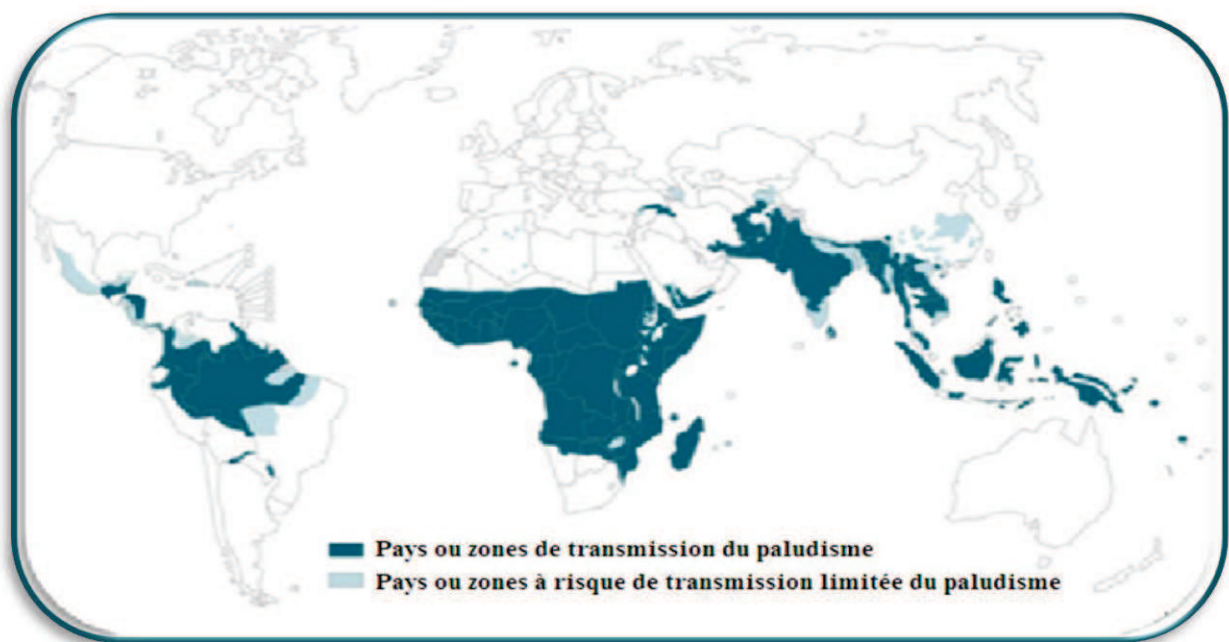
##### I-1-1 Le paludisme dans le monde

Le paludisme (palus = marais) ou malaria (= mauvais air) est une parasitose due à l'hématozoaire *Plasmodium*, transmis à l'homme par des moustiques femelles infectées du genre *Anopheles*.

L'histoire du paludisme se confond avec celle de l'humanité, Le paludisme serait apparu en Afrique avant de s'étendre aux autres continents. Des moustiques fossilisés ont été trouvés dans les couches géologiques de 30 millions d'années et ont probablement contribué très tôt à l'expansion du paludisme (Gilles et Warrell, 1993). Les premiers écrits concernant la description du paludisme figurent dans l'œuvre d'Hippocrate au VI<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ. Très tôt une relation sera faite en Europe entre cette maladie et les marais, et le rôle des moustiques sera même envisagé.

Le XIX<sup>ème</sup> siècle sera marqué par la découverte en 1630 du premier traitement à base d'écorce de Quinquina de la famille des Rubiacées par Don Francisco Lopez. Ceci dans le but de guérir la fièvre palustre du vice-roi du Pérou. Deux siècles seront encore nécessaires pour que les pharmaciens Pelletier et Caventou parviennent à identifier le principe actif du Quinquina, la quinine en 1820. A partir de cette époque, les recherches s'accélérent, et ce n'est qu'en 1880 que le français Laveran découvre dans le sang d'un soldat paludéen, l'agent responsable du paludisme. Dix sept ans plus tard, en 1897, l'anglais Ross, montra que la transmission du paludisme des oiseaux se fait par un moustique du genre *Anopheles*. Peu après, 1898, l'italien Grassi montrera que le paludisme humain était transmis par ce même genre (Djossou *et al.*, 2000). Il fallait attendre 1948 pour que Short et Garnham mettent en évidence l'existence de formes tissulaires des hématozoaires permettant ainsi de compléter le cycle du parasite.

Sur le plan thérapeutique, la seconde guerre mondiale, empêchant l'accès aux plantations indonésiennes de quinquina, ouvrait l'alternative à l'emploi des premiers antipaludéens de synthèse (chloroquine, amodiaquine). La lutte contre le vecteur se remplissait d'espoir avec la découverte des insecticides à action rémanente (DDT) en 1939 qui permirent l'éradication du paludisme dans les régions d'Europe qui ont été encore atteintes. Toutefois, dès 1960, les premiers cas de résistance de *Plasmodium* aux antipaludiques puis des anophèles au DDT sont rapportés (WHO, 1957 ; 1963) mettant fin malgré quelques succès aux espoirs d'éradication du paludisme (Wernsdorfer et Mc Gregor, 1988 ; Oaks et al, 1991).



**Figure 1** : Répartition géographique du paludisme dans le monde (OMS, 2011).

De nos jours, le paludisme sévit surtout dans les régions intertropicales notamment en Afrique subsaharienne (figure 1). Selon des estimations de l'OMS, le paludisme a causé la mort de 655 000 personnes en 2010 dont 86 % sont des enfants de moins de 5 ans, 91% de ces décès ont lieu en Afrique (OMS, 2011).

La résistance des moustiques aux insecticides et des plasmodiums aux antipaludiques continue de s'étendre et peu de nouveaux composés sont découverts. Les programmes actuels de lutte ne visent plus l'éradication du paludisme mais le contrôle de sa transmission par la prévention et le traitement des malades et la lutte antivectorielle.

### I-1-2 Le paludisme au Maroc

Le paludisme constituait avec le typhus historique, la peste, la variole et la fièvre récurrente une des grandes maladies endémo épidémiques qui ravageait le Maroc pendant des siècles (Ministère de la santé, 1996). Il se présentait au début comme une maladie endémo-épidémique avec des poussées épidémiques estivo-automnales fréquentes. Les régions les plus pourvues en eau étaient les plus touchées.

Les premières études entreprises au Maroc, sur les causes de l'endémie palustre datent de 1912. Mais, ce n'est qu'en 1919 que le service de lutte antipaludique fût créé. De grands travaux d'assainissement avec l'utilisation du poisson larvifère *gambusia* ont été lancés en 1929, ceci suite à l'épidémie palustre massive particulièrement meurtrière de 1928.

La période 1930-1959 a été marquée, par l'instauration de plusieurs éléments, essentiels dans la lutte antipaludique dont les plus efficaces sont : l'utilisation d'insecticides et l'emploi de médicaments antipaludiques de synthèse ainsi que la décentralisation de la lutte antipaludique par la constitution de «Services Régionaux d'Hygiène et d'Epidémiologie» en 1940. Malgré les efforts déployés pour la lutte contre la maladie, le paludisme restait localisé aux versants atlantiques de l'Atlas. Ce n'est qu'à partir de 1960 que le Maroc a réorienté sa politique sanitaire, en se dotant d'une infrastructure sanitaire de base capable d'assurer une couverture sanitaire à l'ensemble de la population et de supporter un programme d'éradication du paludisme. Ce dernier a été lancé en 1962, son objectif principal était la délimitation des aires impaludées afin de réduire les surfaces à couvrir par insecticides. C'est ainsi que le programme national de lutte contre le paludisme (PLAP) a été mis en place en 1965. Le service anti-paludique s'était constitué d'une doctrine d'action basée essentiellement sur le dépistage, le traitement des malades et la lutte contre le moustique vecteur de la maladie, l'anophèle femelle. Grâce à cette politique le paludisme subit une régression nette pour aboutir à l'élimination du paludisme à *P. falciparum* vers la fin de 1973 et l'amplification d'un nouveau profil épidémiologique qui est le paludisme d'importation (Naji *et al.*, 1985). Cependant, on assistait à une recrudescence de cas dû à la réactivation d'anciens foyers connus de certaines provinces (Khémisset, 1979, Béni Mellal, Chefchaouen, Nador et Al - Hoceima en 1984). Ceci serait dû d'une part au retour des pluies après une longue sécheresse et d'autre part au relâchement du système de surveillance.

A partir de l'année 1999, une stratégie d'élimination du paludisme autochtone a été mise en place basée sur l'intensification des actions de lutte et la formation des professionnels de santé dans les provinces à risque, par conséquent on assistait à une réduction nette du nombre de cas autochtone pour arriver à 0 cas en 2001. En revanche, suite au relâchement du système de surveillance de lutte antipaludique, il y a eu réactivation du foyer de Chefchaouen en 2002, ce qui a poussé les responsables du PNLN à prendre les mesures nécessaires pour stopper la transmission avant sa diffusion à d'autres provinces et à partir de l'année 2004, le paludisme n'est plus que importé au Maroc. La majorité de ces cas ont été contractés en Afrique tropicale et plus particulièrement en Afrique de l'Ouest et dont l'espèce prédominante est *P. falciparum*.

Aujourd'hui bien que le Maroc a été certifié par l'OMS exempt du paludisme autochtone (Ministère de la santé, 2010), les changements écologiques entraînés par les modifications locales (aménagement de l'environnement, accroissement des projets hydrauliques, extension de l'urbanisation. . .) ou générales (réchauffement de la planète), la présence du vecteur principal *An. labranchiae* et l'accroissement des cas du paludisme importé font que le risque de transmission est toujours présent sur tout le territoire ce qui nécessite une attention et une vigilance vis-à-vis de cette maladie.

## **I-2 L'agent pathogène : Le *Plasmodium***

### **I-2-1 – Taxonomie**

La position systématique de ce parasite d'après Adl *et al.*, 2005 :

**Règne:** Protozoa (Goldfuss, 1818; Owen, 1858)

**Embranchement:** Myzozoa (Cavalier-Smith & Chao, 2004)

**Sous- embranchement:** Apicomplexa

**Classe:** Aconoidasida (Mehlhorn, Peters & Haberkorn, 1980)

**Ordre :** Haemospororida (Danilewsky, 1885)

**Famille :** Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

**Genre:** *Plasmodium* (Marchiafava & Celli, 1885)

### **I-2-2 Cycle des plasmodiums**

Le cycle de développement des plasmodiums humains fait intervenir deux hôtes successifs, l'anophèle et l'homme (figure 2). L'anophèle constitue l'hôte définitif chez lequel se développe le cycle sexué (sporogonie) et l'homme est considéré comme hôte intermédiaire chez lequel s'effectue la multiplication asexuée (schizogonie).

Le cycle de développement du parasite chez l'homme comprend une phase hépatique ou exo érythrocytaire et un cycle érythrocytaire. Au cours de son repas sanguin, l'anophèle femelle inocule à l'homme les sporozoïtes qui se sont accumulés dans ses glandes salivaires. Ces formes infectantes du parasite passent dans la circulation sanguine et gagnent rapidement le foie (Fairley 1947 ; Sidjanski et Vanderberg, 1997) et envahissent les hépatocytes. Ces sporozoïtes s'y multiplient par schizogonie. Ils évoluent en schizonte ou corps bleus contenant plusieurs milliers de parasites. Puis la cellule éclate, libérant ainsi les mérozoïtes qui pénètrent alors dans les hématies pour poursuivre leur développement. Cette phase hépatique (schizogonie- pré- ou exo-érythrocytaire) est totalement asymptomatique sur le plan clinique.

Pendant la phase érythrocytaire, les mérozoïtes peuvent évoluer en trophozoïtes puis en schizontes qui libèrent à nouveau des mérozoïtes (étape cyclique), ou bien évoluer en gamétocytes. Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains parasites se différencient en gamétocytes mâles et femelles uninuclées qui permettront la poursuite du cycle chez l'hôte définitif, le moustique. C'est cette étape qui permet à cet insecte de devenir infectant et de représenter un danger pour l'homme, car contrairement à ce dernier, le moustique ne pâtit pas de la présence du parasite dans son organisme.

La première phase au sein du moustique est la sporogonique. Les gamétocytes ingérés par l'anophèle vont se différencier dans son estomac en gamètes. Le gamétocyte mâle donne 8 gamètes mâles haploïdes qui peuvent fusionner avec un macrogamète femelle haploïde. Cette fécondation aboutit à la formation d'un ookinète qui traverse activement la paroi stomacale et se loge sous la membrane séreuse et se fixe pour devenir un oocyste. Après une première division méiotique et plusieurs mitoses des centaines de sporozoïtes s'individualisent. Ces parasites libérés, par éclatement de l'oocyste mûr, gagnent ensuite les conduits excréteurs des glandes salivaires et s'y accumulent.

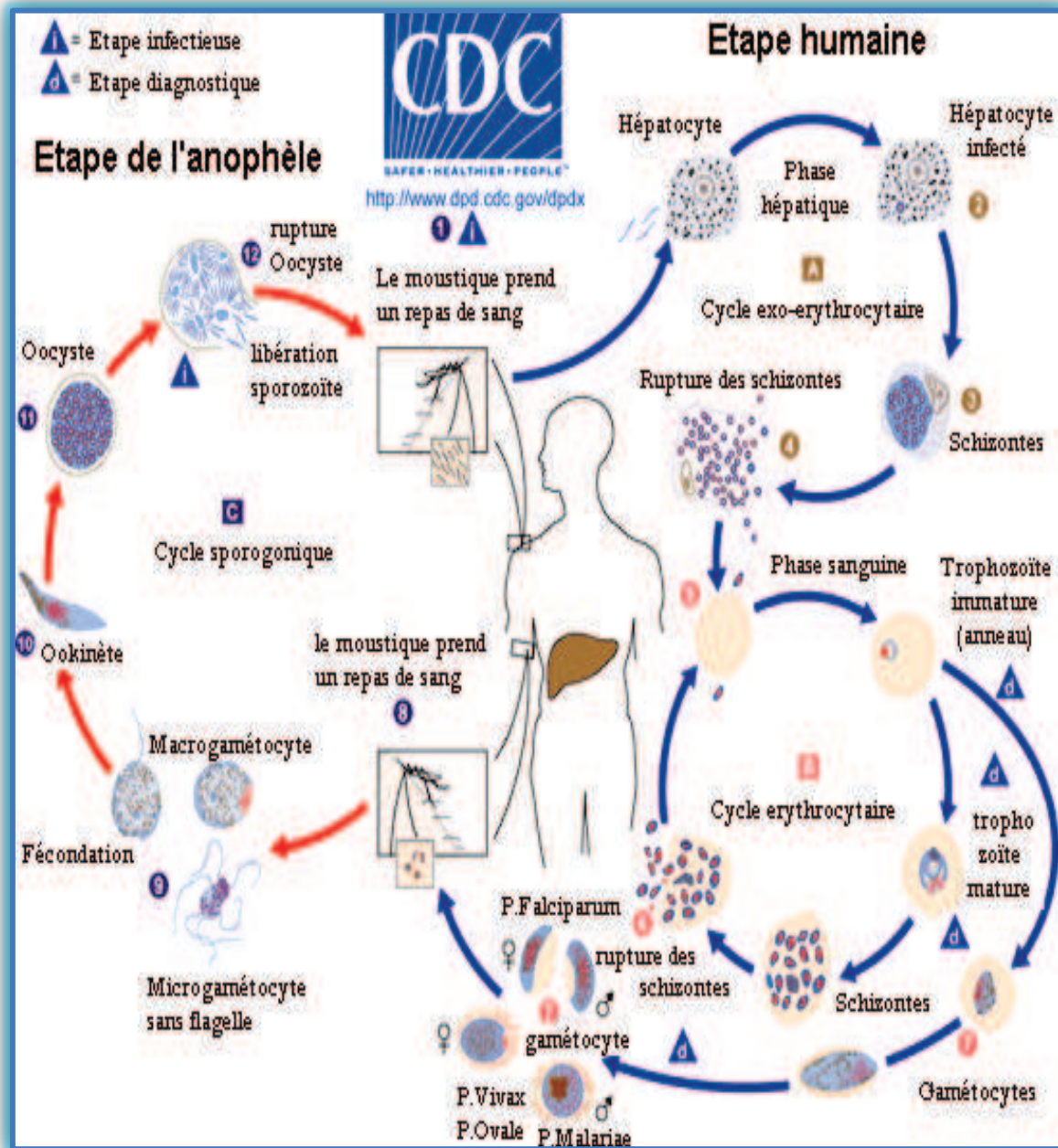


Figure 2 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

(Source : [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm))

Au cours d'un nouveau repas sanguin, l'anophèle injecte à l'homme (ou vertébrés), par l'hypopharynx, quelques dizaines de sporozoïtes avec sa salive anticoagulante ; lesquels gagnent rapidement le foie de l'homme. Il faut environ 10 à 18 jours, selon les conditions environnementales, pour permettre au parasite de finir son cycle sporogonique au sein du moustique, qui devient alors infectant.

## II- L'ANOPHELE : VECTEUR DU PALUDISME

Un moustique est considéré comme vecteur potentiel des plasmodies humaines, et donc du paludisme, du fait de sa compatibilité génétique avec le parasite, de sa longévité au moins égale à la durée du cycle extrinsèque du parasite et de son anthropophilie (Sonnier, 1999 ; Pages *et al.*, 2007).

Les moustiques du genre *Anopheles* (figure 3) assurent la transmission biologique active du *Plasmodium*. Seules les femelles sont vectrices de la maladie, puisqu'elles sont, à la différence des mâles, hématoiphages.



**Figure 3 :** *Anopheles* vecteur du paludisme : *An. labranchiae*  
(Source : <http://piclib.nhm.ac.uk/results.asp?txtkeys1=anopheles+labranchiae>)

## II-1 Taxonomie

Les vecteurs du paludisme humain appartiennent au genre *Anopheles* qui fait partie de la famille des *Culicidae* de l'ordre des Diptères (figure 4).

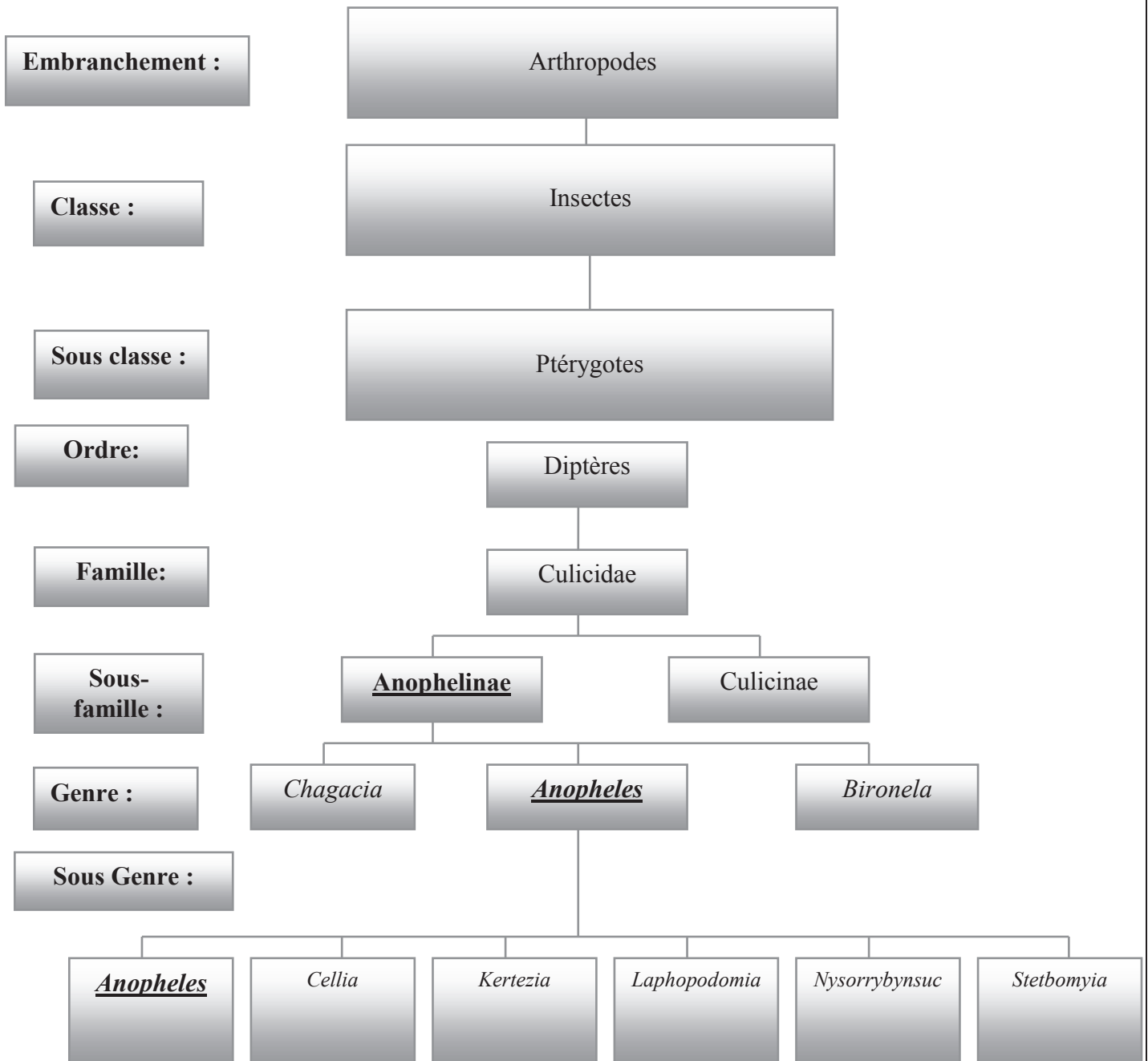
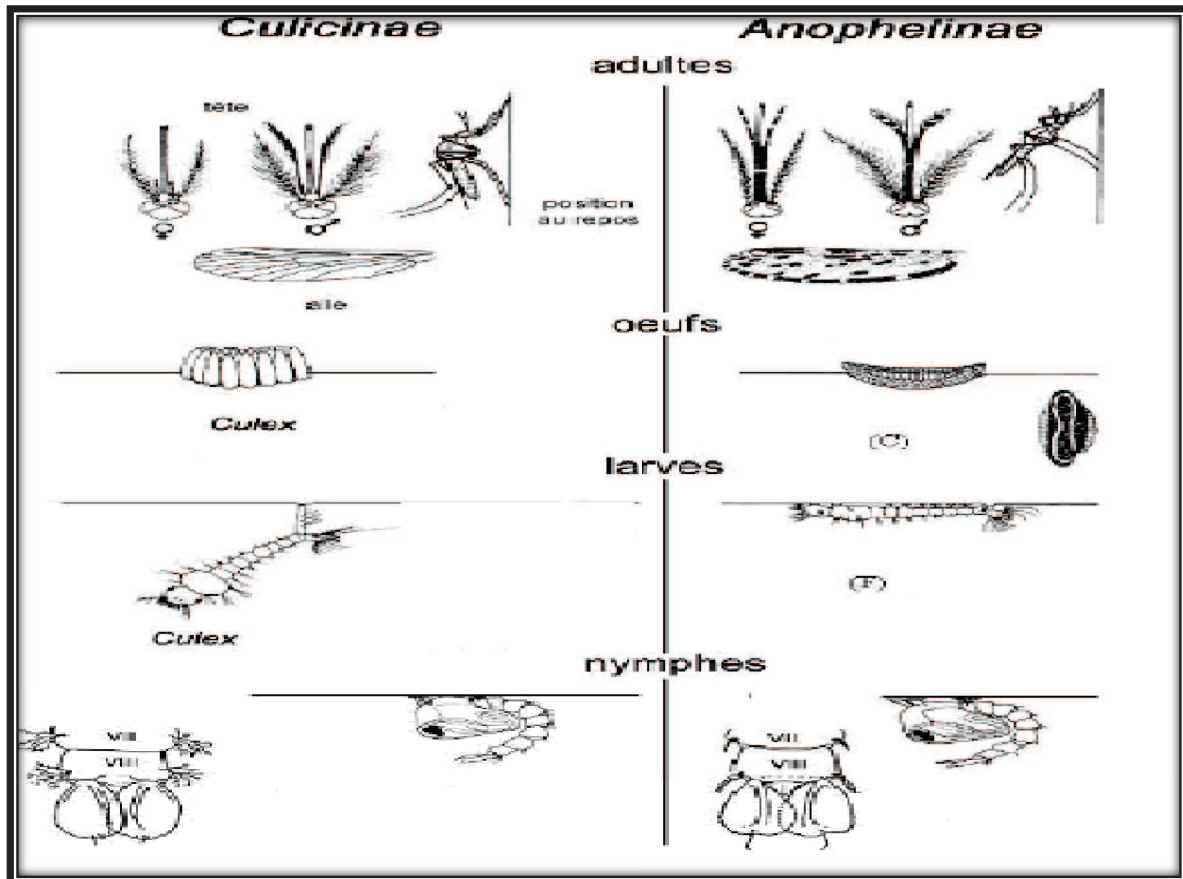


Figure 4 : Classification des anophèles d'après Harbach, 2004

### a- Caractères distinctifs entre les anophelinae et les culicinae

Les moustiques sont morphologiquement différents les uns des autres. Il existe des différences entre les deux sous-familles Anophelinae et Culicinae, qui portent sur les œufs, les larves, les nymphes, les palpes maxillaires, et la position de l'adulte au repos (Figure 5).



**Figure 5 :** Particularités morphologiques des deux sous familles *Anophelinae* et *Culicinae*

(Lane et Crosskey, 1993)

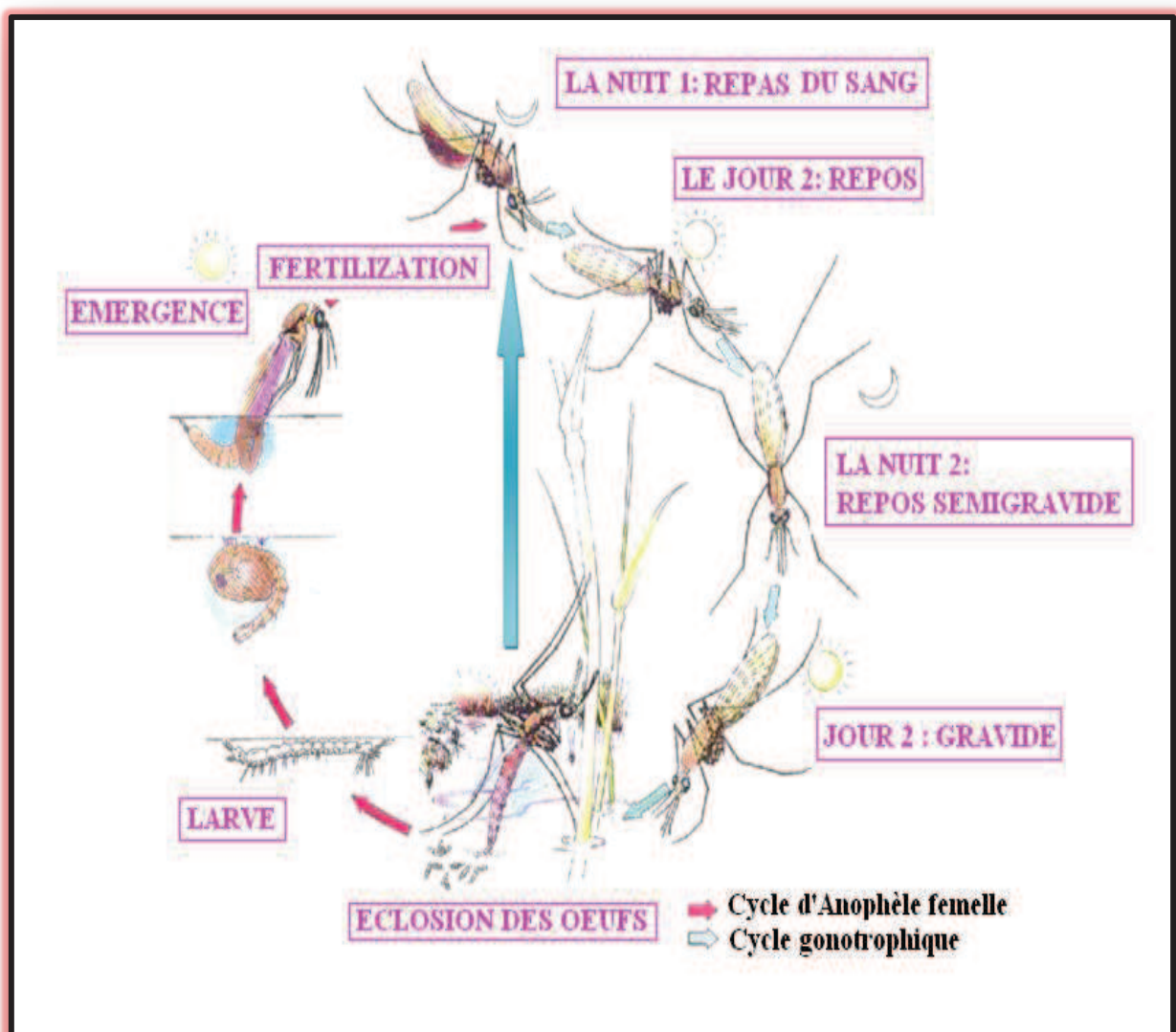
On peut reconnaître à l'œil nu le genre *Anopheles* du genre *Culex* par sa position : les larves d'anophèles sont dépourvues de siphon et restent horizontales sous la surface de l'eau. Tandis que les larves de *Culicinae* ont un siphon visible et sont obliques ou plus ou moins verticales par rapport à la surface de l'eau. Concernant l'anophèle femelle, l'adulte se reconnaît à sa position oblique, au repos, par rapport au support sur lequel il est posé, tandis que le *Culex* adulte se tient parallèlement à ce support (figure 6).

## II-2 Cycle biologique et morphologie des anophèles

Comme toutes les espèces de moustique à métamorphose complète (holométaboles), le développement des anophèles est caractérisé par la succession de quatre stades de développement (œuf, larve, nymphe et adulte).

Le cycle biologique du moustique se compose de deux phases (figure 6) :

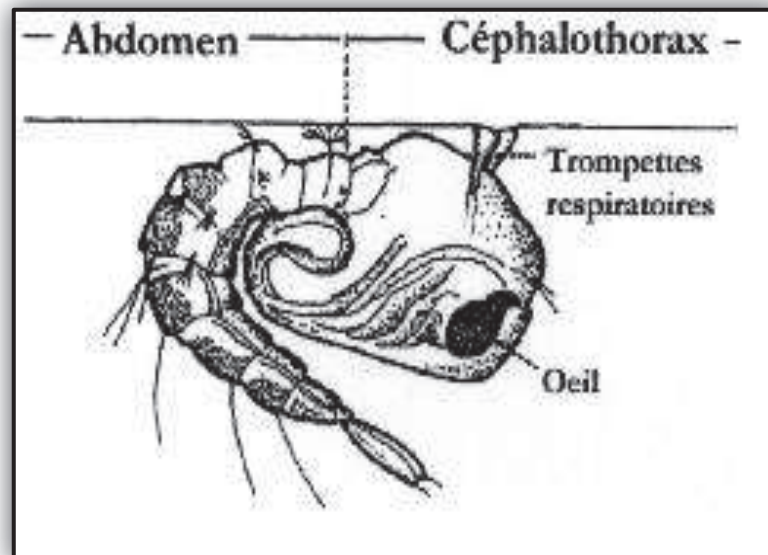
- une première phase aquatique qui recouvre la vie pré-imaginale (les stades œufs, larvaires et nymphaux),
- une seconde phase aérienne qui concerne l'adulte, ou imago.



**Figure 6** : Cycle de vie d'un Anophelinae d'après Knell 1991

### II-2-1 Phase aquatique

La phase aquatique comporte trois stades successifs : l'œuf, la larve et la nymphe. La durée du développement larvaire dépend de la température de l'eau et de la disponibilité en nourriture. Plus la température est élevée, plus le développement est rapide (OMS, 2003). Après accouplement, l'anophèle femelle pond des lots de cent à cent cinquante œufs qui sont déposés isolément à la surface de l'eau. Ils sont plus ou moins ovoïdes, mesurant en moyenne 0,6 à 0,8 mm de longueur et pourvus latéralement de flotteurs leur permettant de conserver une position horizontale. Leur éclosion libère une larve de stade I qui mesure environ 1 mm. Après un à deux jours, elle mue et devient une larve de stade II, suivi du troisième et quatrième stade, à intervalle de deux jours environ. Les larves des anophèles sont dépourvues de siphons respiratoires et se tiennent parallèlement à la surface de l'eau. Les larves se nourrissent de microparticules. La durée de vie larvaire varie entre 7 et 20 jours en fonction des espèces et suivant les conditions du milieu. Elle peut être réduite ou allongée par les conditions défavorables (Holstein. 1949). La larve de stade IV donne naissance à une nymphe en forme de virgule qui reste généralement à la surface de l'eau mais plonge dès qu'elle est dérangée en déployant et reployant brusquement l'abdomen terminé par deux palettes natatoires. Au moment de l'émergence de l'adulte, la cuticule se fend longitudinalement. L'adulte se gonfle d'air et s'extrait de l'exuvie à la surface de l'eau (figure 7).



**Figure 7 :** Schéma d'une nymphe d'anophèle

(Source : <http://www.eid-med.org/fr/moustique/moustiqbiologiecentre.htm>)

### II-2-2 Phase aérienne

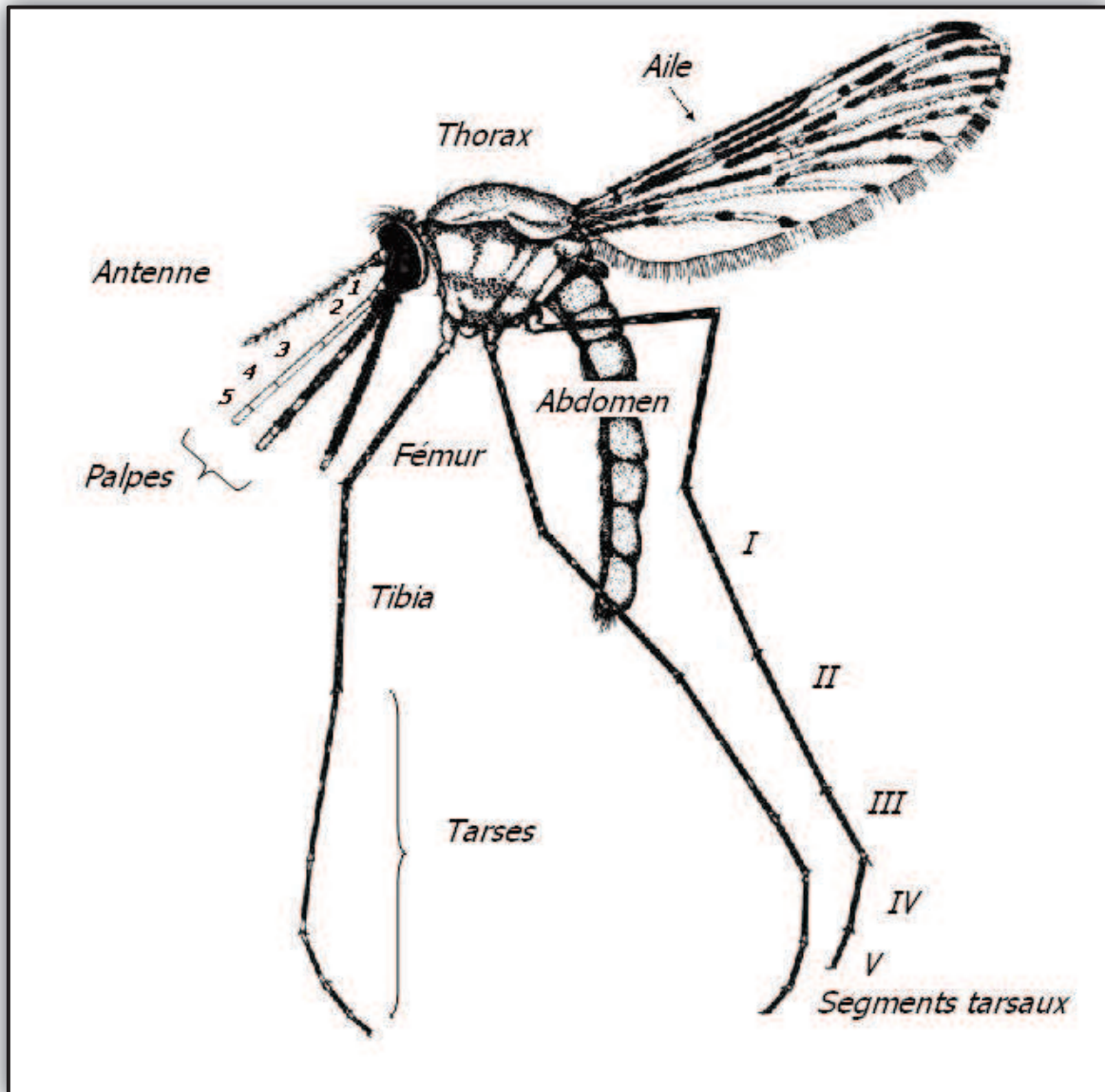
Après quelques jours de vie nymphale, la cuticule du céphalothorax de la nymphe mature se fracture dorsalement et laisse sortir l'adulte ou « *imago* » hors de l'eau en libérant successivement les différentes parties de son corps: thorax, tête, antennes, ailes, trompe, pattes, abdomen. Cette émergence ne dure que quelques minutes.

L'adulte de l'anophèle est pourvu de (figure 8):

- **une tête** portant deux gros yeux composés, une paire d'antennes de quinze articles à soies nombreuses et longues chez le mâle, rares et courtes chez la femelle. La trompe, ou proboscis, est formée d'une pièce buccale particulière, le labium, formant une gouttière souple entourant les autres pièces buccales vulnérantes chez la femelle: l'hypopharynx, Ces caractéristiques morphologiques permettent dans le même temps à l'anophèle femelle, lors de la piqûre, d'ingérer un volumineux repas sanguin et d'injecter avec sa salive le stade infectant (sporozoïte) du *Plasmodium*. Deux palpes maxillaires, dont la longueur et la forme varient avec le genre et le sexe, se situent de part et d'autre de la trompe. Les anophèles se caractérisent par des palpes dont la longueur est égale à la trompe. Ceci est vraies pour les 2 sexes mais chez les mâles, elles sont ronflées à leur extrémité et couvertes de poils.

- **un thorax** est formé de trois segments, portant chacun une paire de pattes dont le premier est réduit. C'est sur le second, très développé et renfermant de puissants muscles alaires, que s'insère une paire d'ailes. Sur le troisième est placée une paire d'haltères, ou balanciers, qui sont l'homologue d'une paire d'ailes postérieures atrophiées, et qui joue un rôle dans l'équilibration du vol. Les six pattes, longues et graciles, sont formées de neuf articles. Les ailes présentent de nombreuses écailles claires et sombres : leur arrangement sur le rebord costal est caractéristique des anophèles.

- **un abdomen** est constitué de dix segments, dont sept sont bien visibles. Chaque segment est constitué d'une plaque chitineuse dorsale et d'une plaque ventrale reliée par une membrane qui autorise la dilatation de l'abdomen lors de la prise d'un repas de sang et lors de l'élaboration de la ponte dans les ovaires. Les trois derniers segments portent l'anus et les appendices génitaux (ou génitalia).



**Figure 8:** Principales parties morphologiques d'un adulte femelle d'*Anopheles*, d'après Holstein, 1949 (Carnevale & Robert., 2009)

L'adulte se repose pendant 10 à 24 heures dans un gîte de repos (végétation, termitière, rocher...) avant de s'envoler. Ce temps est nécessaire pour le durcissement de la cuticule et l'achèvement du développement des organes sexuels chez le mâle (Mouchet et al, 2004). Les adultes mâles et femelles se nourrissent de sucs d'origine végétale mais seules les femelles sont hémato-phages. Après 24 à 48 heures de vie adulte, la femelle va à la recherche de son premier repas sanguin. Elle a besoin de sang comme source de protéines pour le développement et la maturation de ses œufs. La ponte a lieu en général 3 jours après le repas sanguin ; la femelle peut alors prendre un nouveau repas de sang.

Les femelles d'anophèles s'accouplent généralement une seule fois et conservent le sperme dans les spermathèques, tout au long de leur vie, pour féconder tous les lots d'œufs successifs. Elles ont besoin d'un repas sanguin pour porter les œufs à maturation. Le premier repas sanguin est pris entre le troisième et le sixième jour. Après chaque repas de sang, la femelle se repose dans un abri jusqu'au développement complet des œufs (cycle gonotrophique).

### **II-3 Ethologie et écologie des anophèles**

#### **a- Recherche de l'hôte**

Outre les facteurs qui contrôlent la faim chez les insectes, il existe des stimuli spécifiques qui guident les moustiques vers leurs hôtes, ces stimuli d'attraction varient avec les espèces de sorte que chacune d'entre elles manifeste des préférences trophiques.

Les principaux stimuli permettant le repérage des proies sont : les courants de convection provoqués par la respiration de la proie, les odeurs corporelles (acide lactique) et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) émis, la chaleur, l'humidité relative, les couleurs et les mouvements. L'ouïe est également utilisée par le moustique pour repérer sa cible (Maurille, 2005).

#### **b- Choix de l'hôte**

L'hôte préférentiel est le type d'hôte qui est le plus fréquemment attaqué par une espèce donnée. La plupart des espèces ont été classées comme zoophiles ou anthrophiles, suivant celles s'attaquent de façon prédominante aux animaux ou à l'homme. Aucune espèce n'est exclusivement anthropophile et les espèces hautement anthropophiles sont très peu nombreuses. Après leur repas sanguin, les anophèles femelles doivent trouver un endroit favorable pour se reposer et digérer le sang: soit à l'intérieur des maisons, elles sont dites endophiles ; soit à l'extérieur des maisons dans toute une série d'abris naturels, elles sont alors dites exophiles. L'exophilie peut être obligatoire (choix impossible) ou facultative (choix possible) ; elle est prédéterminée lorsque les moustiques se nourrissent à l'extérieur et évitent d'entrer dans les maisons ou bien lorsqu'ils piquent à l'intérieur, puis s'échappent avant le lever du jour pour se réfugier dans la nature. Les anophèles endophages piquent à l'intérieur des maisons et des étables.

### III- LES ANOPHÈLES DU MAROC ET DE L'ALGÉRIE

#### III-1 Les anophèles du Maroc

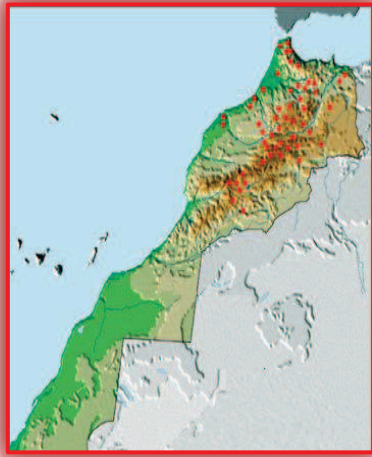
Au Maroc, les premiers travaux réalisés sur les anophèles, vecteurs du paludisme, remontent au début du XX<sup>e</sup> siècle. En effet, le premier inventaire des espèces anophéliennes a été établi par Gaud et al. (1949). Il a été actualisé par Guy (1963) après l'addition d'*An. d'thali* aux huit espèces initialement inventoriées. Quarante et un ans plus tard, Trari *et al* (2004) ont publié la liste des moustiques du Maroc y compris celle des anophèles qui comprenait les neuf espèces déjà publiées par Guy (1963).

Faraj *et al.*, (2010) ont actualisé cette liste en ajoutant *An. petragnani* au 9 espèces déjà connues (tableau 1). A cette date, dix espèces d'anophèles sont signalées au Maroc; six du sous-genre *Anopheles* et quatre du sous-genre *Cellia* :

**Tableau I. 2:** Les espèces anophéliennes signalées au Maroc (Faraj *et al.*, 2010)

sous-genre <i>Anopheles</i> Meigen, 1818	sous-genre <i>Cellia</i> Theobald, 1902
▪ <i>An. algeriensis</i> Theobald, 1903,	▪ <i>An. cinereus</i> Theobald, 1901,
▪ <i>An. claviger s.s</i> Meigen, 1804,	▪ <i>An. d'thali</i> Pallon, 1905,
▪ <i>An. labranchiae</i> Falleroni, 1926,	▪ <i>An. multicolor</i> Cambouli, 1902,
▪ <i>An. marteri marteri</i> Sénevet et Prunelle, 1927,	▪ <i>An. sergentii</i> Theobald, 1907.
▪ <i>An. petragnani</i> Del Vecchio 1939,	
▪ <i>An. ziemanni</i> Gruenberg, 1902 .	

Selon Faraj *et al.*, (2010), *An. labranchiae*, *An. cinereus*, *An. sergentii*, et *An. claviger s.l.*, sont les espèces les plus fréquentes. *An. d'thali* et *An. marteri*, sont des espèces peu fréquentes. *An. algeriensis* et *An. multicolor* sont reconnus comme des espèces rares et *An. ziemmani* est une espèces qui a disparue des récoltes. Ces mêmes auteurs ont effectué une mise au point sur la systématique, la distribution géographique et la compétence vectorielle de toutes les espèces recensées sur la base de récentes études écologiques et moléculaires (figure 9).



*An. claviger et An. petragrani*



*An. marteri*



*An. cinereus*



*An. labranchiae*



*An. algeriensis*



*An. multicolor*



*An. d'thali*



*An. sergentii*



*An. ziemanni*

**Figure 9:** Carte de distribution des principaux anophèles du Maroc  
(Source : <http://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/identiciels/culmed/html/taxa/index.html>)

### III-2 Les anophèles de l'Algérie

L'anophélisme en Algérie a été très bien étudié à la fin des années soixante (Holstein, 1970), puis en 1983 avant l'ouverture de la route transsaharienne (Ramsdale et De Zulueta, 1983).

En effet, la faune anophélienne algérienne était variée. De nombreuses espèces appartenant à plusieurs genres et sous-genres vivent dans de vastes régions du territoire (Senevet et Andarelli, 1956 ; Viegas, 1978). Parmi les principales espèces anophéliennes décrites à cette époque sont : *An. dthali* (Iherir, Béchar, sud du pays), *An. hispaniola* (toute l'Algérie), *An. labbranchiae* (nord de l'Algérie), *An. multicolor* (toute l'Algérie), *An. rhodesiensis rupicolus* (Iherir et Amais), *An. rufipes broussisi* (Iherir et Djanet), *An. sergentii* (toute l'Algérie) et *An. algeriensis* (Batna, au nord-est de l'Algérie) (Ramsdale et De Zulueta, 1983). Récemment, Hammadi *et al.*, donnent en 2009, une revue sur la répartition géographique des espèces sahariennes dont la plupart ont été inventoriées par Ramsdale et De Zulueta, (1983)( figure 10).

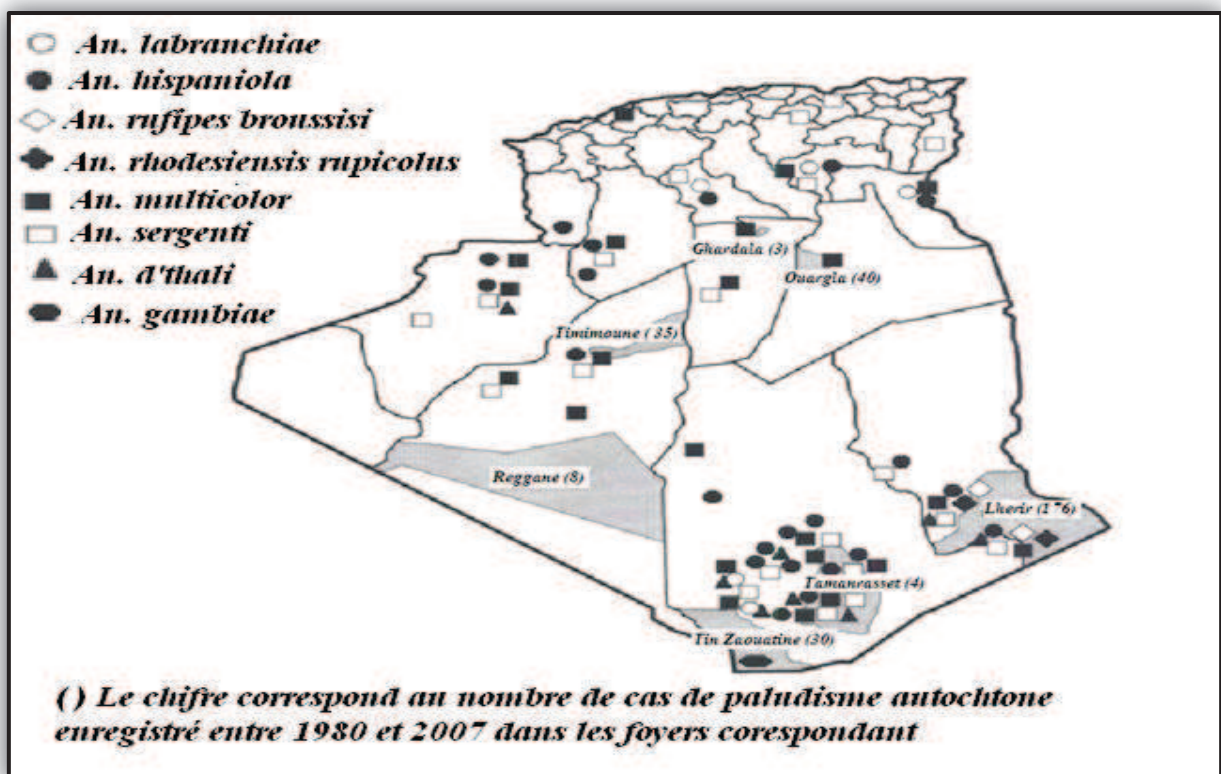


Figure 10 : L'anophélisme en Algérie (Hammadi *et al.*, 2009)

#### IV- PRINCIPAUX GROUPES D'ESPÈCES ANOPHÉLIENNES VECTRICES DANS

**LE MONDE** Sur 484 espèces du genre *Anopheles* répandus dans le monde, seule une soixantaine peut transmettre le paludisme, et une vingtaine sont à l'origine de la majorité des cas.

Les biogéographes ont divisé la planète en 6 régions, d'après la répartition des espèces animales et végétales, et ils ont été amenés à créer des sous régions pour rendre compte des différences au sein de certaines régions (tableau 2).

**Tableau 2:** Les principaux anophèles impliqués dans la transmission des plasmodies humaines (Harbach, 2004)

Régions	Sous régions	Vecteurs principaux	Vecteurs secondaires
Néarctique	Amérique au nord du Mexique	<i>An. quadrimaculatus</i> , <i>An. freeborni</i>	<i>An. Alloimanus</i>
Néotropicale	Amérique centrale et Caraïbes Amérique du sud	<i>An. Darlingi</i> <i>An. albimanus</i> <i>An. pseudopunctipennis</i> <i>An. aquasalis</i> <i>An. argyritarsis</i>	<i>An. Aquasalis</i> <i>An. aztecus</i> <i>An. punctimacula</i> <i>An. bellator</i> , <i>An. cruzi</i>
Paléarctique	Eurasie septentrionale et tempérée Méditerranée orientale	<i>An. atroparvus</i> <i>An. sacharovi</i> <i>An. sergenti</i>	<i>An. sinensis</i> <i>An. messae</i>
	Asie mineure Nord de la péninsule arabique Afrique du nord et Sahara septentrional	<i>An. sacharovi</i> <i>An. superpictus</i> <i>An. stephensi</i>	<i>An. pulcherrimus</i> <i>An. multicolor</i>
	Plateau iranien	<i>An. labranchiae</i> <i>An. sergenti</i> <i>An. sacharovi</i> <i>An. culicifacies</i> <i>An. Stephensi</i> , <i>An. superpictus</i>	<i>An. multicolor</i> <i>An. annularis</i>
Orientale	Péninsule indienne	<i>An. culicifacies</i> <i>An. stephensi</i> <i>An. fluviatilis</i> <i>An. dirus</i> <i>An. philippiniensis</i> <i>An. minimus</i>	<i>An. annularis</i> <i>An. varuna</i>
	Péninsule indochinoise et Malaisie	<i>An. sundaicus</i> <i>An. minimus</i>	<i>An. sinensis</i>
	Chine centre et sud	<i>An. dirus</i> <i>An. Maculates</i> , <i>An. letifer</i>	<i>An. jeyporiensis</i>
	Indonésie (sauf Nelle-Guinée et Molluques) Philippines	<i>An. Minimus</i> , <i>An. Dirus</i> , <i>An. Anthropophagus</i> , <i>An. sinensis</i>	<i>An. jeyporiensis</i> <i>An. pattoni</i>
		<i>An. aconitus</i> <i>An. balabacensis</i> <i>An. Sundaicus</i> , <i>An. jlavirostris</i>	<i>An. barbirostris</i> <i>An. littoralis</i>
Australienne	Australie Nelle-Guinée Vanuatu, Mélanésie	<i>An. Farauti</i> , <i>An. punctulatus</i>	<i>An. koliensis</i>
Afrotropicale	Afrique au sud du Sahara, Madagascar, sud-ouest de la péninsule arabique	<i>An. gambiae</i> <i>An. arabiensis</i> <i>An. funestus</i> , <i>An. moucheti</i> <i>An. nili</i>	<i>An. Pharoensis</i> <i>An. coustanti</i> <i>An. paludis</i> <i>An. Hargreavesi</i> <i>An. melas</i> , <i>An. merus</i>

## V- LE GROUPE PALÉARCTIQUE D'ANOPHELES MACULIPENNIS

### V-1 Historique et taxonomie

*Anopheles maculipennis* a été décrit et nommé pour la première fois à partir des échantillons collectés en Allemagne en 1818 (Meigen, 1818 ; White, 1978). L'histoire de ce complexe est étroitement liée avec celle du paludisme, en 1897 Ronald Ross, médecin britannique de l'armée des Indes, montre que la transmission du paludisme des oiseaux se fait par un moustique. Peu après, Giovanni Batista Grassi montrera qu'il en est de même pour le paludisme humain, transmis par l'anophèle femelle. Dirigé par ce scientifique, une équipe de chercheurs italiens, qui comprenait Bignami et Bastianelli, avait collecté les moustiques *An. claviger* et les a nourrit avec du sang de patients paludéens. Le cycle sporogonique complet de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae* a été démontré. En 1899, les moustiques infectés en se nourrissant sur un patient à Rome ont été envoyés à Londres, où ils se sont nourris sur deux bénévoles, qui ont tous les deux développés le paludisme tierce bénin. (Grassi *et al.*, 1899). Suite à ces découvertes, plusieurs critiques ont été émises par Ross dont les plus connues étaient d'une part l'absence du paludisme dans des régions à forte densité d'anophèles, un phénomène qui était connu sous le nom « anophélisme sans paludisme » (Hackett, 1934,1937) et d'autre part, la disparition de la maladie dans des zones d'endémie en Europe avec présence de fortes densités d'anophèles sans aucun effort d'éradication (Fatini, 1994).

Le problème du paludisme en Europe a été largement étudié jusqu'à la fin de la première guerre mondiale, lors du retour des soldats infectés qui ont conduit à des épidémies locales à travers le continent, inversement aucun cas du paludisme n'a été signalé dans les autres régions malgré la présence abondante d'*Anopheles maculipennis* (Linton *et al.*, 2003). Cette découverte a poussé les chercheurs à déduire que le problème n'était pas la présence du phénomène d'anophélisme sans paludisme mais la présence d'*Anopheles maculipennis* sans la présence de la maladie. Ceci a incité les chercheurs à s'intéresser de plus en plus à ce complexe. Cependant, Stephens et Christophers (1906) ont montré que les différentes espèces d'anophèles n'ont pas la même importance dans la transmission du paludisme. Ainsi, il a été découvert qu'il y a une différence dans la biologie et le comportement des populations dans différentes régions :

- les larves sont limitées aux eaux douces alors que d'autres vivent dans les eaux saumâtres ;
- la découverte des races anthropophiles et zoophiles ;
- une différence dans le comportement et l'accouplement (eurygamie, sténogamie) de certaines populations ont été également observé (Becker *et al.*, 2003).

Ces études épidémiologiques se poursuivaient jusqu'à 1926, où Falleroni a découvert deux types d'œufs, les uns foncés à taches noires et barrées transversalement aux extrémités subapicales, les autres plus pâles, ornés seulement de taches noirâtres. Les œufs foncés "barrés" sont ceux d'*An. maculipennis* « var » *messeae* (race fréquente dans les régions non impaludées), les œufs pâles étant ceux d'*An. maculipennis* « var » *labranchiae*, variété fréquente dans les régions impaludées (Falleroni, 1926 ; Hackett et al, 1932). Au même temps, les travaux de biométrie de Van Thiel (1927) ont montré qu'il existait deux formes de longueur d'ailes. Ce résultat a été confirmé par De Buck, Schoute et Swellengrebel (1930-1932). La forme microptère est anthropophile, se nourrit occasionnellement en hivernant. Elle est issue surtout des larves vivant en eau saumâtre ; les femelles accumulent dans les conditions naturelles d'hivernation des réserves dans les tissus gras (dissociation gonotrophique de Swellengrebel, (1929) au lieu de mûrir leurs œufs. La forme macroptère est issue de larves vivant en eau douce ; les femelles passent l'hiver dans les étables en état de repos complet, ne manifestant aucune activité de *piqûre*. La découverte de deux espèces voisines donnant lieu à la dénomination de la forme microptère *An. maculipennis* « var » *atroparvus* van Thiel 1927, et permit l'explication de l'épidémiologie du paludisme en Hollande : la variété *atroparvus* anthropophile est la seule en cause comme vecteur du paludisme (Grenier, 1960).

Missiroli *et al.*, (1933) ont désigné et caractérisé cinq «variétés» d'*Anopheles maculipennis* qui n'ont pas la même habilité de transmettre le parasite: *basilei*, *messeae*, *atroparvus*, *labranchiae* et *elutus*. C'est ainsi, qu'entre 1934 et 1936, de nombreux auteurs ont confirmé la présence du complexe *Anopheles maculipennis* comme une espèce formée par plusieurs entités différentes avec des différences dans les capacités vectorielles (Hackett, 1934). Par conséquent, trois nouvelles "variétés" ou "" biotypes d'*An. maculipennis* ont été décrites par Roubaud et ses collaborateurs: *falax* (Roubaud, 1934) de Normandie ; *sicaulti* (Roubaud, 1935) du Maroc et *cambournaci* du Portugal (Roubaud & Treillard, 1936). D'autres variétés ont été décrites notamment la variété *melanoon* dont la répartition géographique est limitée au nord de l'Italie, la région du Strasbourg, et la cote nord-est de l'Espagne (Hackett et Missiroli, 1935). De même, la «variété» *subalpinus* a été signalée en Espagne, au nord-ouest

de l'Italie, en Albanie et en Macédoine (Hackett et Lewis, 1935). Par la suite, Missiroli (1935) a identifié la nouvelle «variété» *pergusae* du lac Pergusa, en Sicile, il a conclu que les œufs sont des exemples aberrants de la forme commune de *labranchiae* en Sicile. Ainsi, en 1936, *cambournaci* a été reconnu comme une variété proche d'*An atroparvus* avec une petite différence dans les œufs et le comportement (Roubaud et Treillard, 1936). Toutefois, les travaux de Hackett, Martini et Missiroli (1932 à 1935) conduisirent à la reconnaissance de cinq “races”, dont certaines furent mises ultérieurement en synonymie, la race d'œufs barrés de Falleroni (1932) correspondant à la forme type (*typicus* de Hackett et Missiroli, 1935). On aboutit ainsi à la liste suivante des races et variétés du complexe : *An. maculipennis maculipennis* Meigen 1918 (= *typicus* Hackett et Missiroli 1935), *An. maculipennis messeae* Falleroni 1926 ; *An. maculipennis atroparvus* Van Thiel 1927 ; *An. maculipennis labranchiae* Falleroni 1926 ; *An. sacharovi* Favre 1903.

Bates (1940) a proposé une nouvelle classification du complexe *Anopheles maculipennis* dans la région paléarctique. Il a divisé le groupe en cinq espèces différentes: *An. maculipennis* s.s., *An. messeae* Falleroni, 1926, *An. melanoon* avec deux sous-espèces, (*An. melanoon melanoon* Hackett, 1935 et *An. subalpinus melanoon* Hackett et Lewis, 1935) *An. labranchiae* avec également deux sous-espèces, (*An. labranchiae labranchiae* et *An. labranchiae atroparvus*), et *An. sacharovi* Favre, 1903. Toutefois, d'autres travaux scientifiques ont aboutit à une révision de la taxonomie et la nomenclature du groupe *Anopheles maculipennis* (Bates 1940 ; Senevet et Andarelli, 1956 ; Rioux *et al.*, 1959 ; Guy *et al.*, 1976 ; White, 1978). Ces études se basent sur des critères et des techniques variées notamment les critères morphologiques approfondies, les études des croisements et en fin des méthodes cytogénétiques (Frizzi 1947a). Ainsi, les études de croisements expérimentaux ont contribué de façon remarquable à l'émission de l'espèce *maculipennis* (Grenier, 1960) comme le montrent les résultats qui en découlent : certaines “races” ont des comportements différents au cours de l'accouplement: “*typicus*”, *messeae*, *subalpinus*, *sacharovi* ne peuvent s'accoupler dans un espace réduit (eurygamie de Roubaud) contrairement à l'*atroparvus* et *labranchiae* qui peuvent s'accoupler en espace réduit (sténogamie de Roubaud), *labranchiae* et seulement dans certaines conditions d'éclairage.

Par ailleurs ces résultats démontrent que certaines “formes” sont sexuellement isolées : confrontés avec les données fournies par l'éthologie (Roubaud), l'écologie (Missiroli) et la biométrie (Bates et Hackett, 1939), ils conduisent à admettre l'individualisation de véritables

espèces. Ils reconnaissent ainsi trois espèces dans le complexe : *An. maculipennis*, *An. labranchiae*, *An. sacharovi*.

La liste des espèces du complexe a été établie par Bates et ses collaborateurs (in Boyd, 1949). Dans cette liste certaines formes sont considérées comme des sous-espèces, d'autres comme des espèces jumelles (« cryptic-species » de Bates) Cette classification est similaire à celle établie par Stone et al. 1959 et dont les membres sont : *An. maculipennis* Meigen 1818 ; *An. maculipennis messae* Falieroni 1926; *An. maculipennis melanoon* Hackett 1934 (= *An. melanoon* Hackett et Missiroli 1935: dont *An. maculipennis subalpinus* Hackett et Lewis 1935 est synonyme (= *An. melanoon subalpinus* Hackett et Lewis 1935). *An. sacharovi* Favre 1903 ; *An. labranchiae labranchiae* Falieroni 1926 ; *An. labranchiae atroparvus* van Thiel 1927.

Par ailleurs, l'introduction des méthodes cytogénétiques a largement contribué à l'identification des différents types et variétés du complexe *maculipennis* et à la compréhension de certains aspects obscurs quant à la répartition géographique de certaines espèces (Frizzi, 1956; Rioux et Ruffié, 1957; Postiglione et al, 1970 ; Novikov et Alekseev, 1989). Ainsi, Frizzi (1947a) a mené des études sur les chromosomes salivaires des larves en prenant l'arrangement d'*An. atroparvus* comme témoin "standard" et a dressé la carte chromosomique spécifique à chaque espèce y compris les hybrides obtenus à la suite des croisements expérimentaux. C'est ainsi qu'il a décrit pour la première fois la carte chromosomique d'une espèce de moustique, *An. Atroparvus* et a établi les caractéristiques chromosomiques des autres anophèles notamment d'*An. labranchiae*, *An. elutus*, *An. typicus*, *An. messeae* et *An. subalpinus* (Frizzi 1947b, 1953). L'interprétation de ces données montre que les cartes chromosomiques des différentes espèces présentent des différences relativement minimales avec un appariement des chromosomes chez les hybrides. Les boucles d'inversion sont bien définies d'une espèce à l'autre alors que les bandes sont similaires dans les autres parties chromosomiques. Par ailleurs, ces études cytogénétiques (Frizzi, 1951) viennent affirmer les résultats obtenus par les deux équipes de Bates, Beklemishev et la Face qui stipulent que le complexe *maculipennis* de la zone paléarctique représente un ensemble de cinq espèces jumelles et deux sous-espèces : *An. labranchiae labranchiae* Fall.: *An. messeae* Fall; *An. maculipennis (typicus)* Meigen ; *An. subalpinus subalpinus* Hackett et Lewis ; *An. sacharovi* Favre (Grjebine et al., 1976).

Toutefois, les techniques cytogénétiques, bien qu'elles permettent l'établissement des bandes chromosomiques des différentes espèces du groupe *maculipennis*, présentent des

limites et seraient insuffisantes pour la différenciation des espèces et par conséquent ne peuvent être utilisées comme instrument d'identification standard. En effet, deux groupes d'espèces peuvent présenter les mêmes bandes chromosomiques (homosequentiels) comme c'est le cas d'*atroparvus-labbranchiae-sicaulti* (White, 1981 ; De Zulueta *et al.*, 1983) et *maculipennis-subalpinus-melanoon* (Rioux *et al.*, 1959). La mise en place de nouvelles méthodes et critères de différenciation semble être primordiale. C'est ainsi que l'observation des chromosomes polythènes a permis l'identification d'une nouvelle espèce du groupe *An. beklemishevi*, a été identifiée principalement grâce à l'observation des chromosomes polythènes par Stegnii et Kabanova 1978. L'introduction de nouvelles techniques fiables et complémentaires aux techniques préalablement citées a permis une révision majeure de la taxonomie et la nomenclature du complexe *Anopheles maculipennis* (White 1978). Ce dernier a divisé le complexe en neuf espèces jumelles dont : *An. atroparvus*; *An. beklemishevi*; *An. labbranchiae*; *An. maculipennis*; *An. martinius*; *An. melanoon*; *An. messeae*; *An. sacharovi* et *An. sicaulti*. Sur la base des preuves disponibles, White proposait la résurrection des deux espèces (*martinius* et *sicaulti*) et la suppression comme synonymes possibles de *beklemishevi* et *messeae*, *alexandraeshingarevi*, *lewisi* et *selengensis*. Cette dernière suggestion a été ignorée et selon les suppléments du catalogue des moustiques du monde (Ward, 1984; Gaffican et Ward, 1985; Ward, 1992) *selengensis* est effectivement considéré comme synonyme à *An. lewisi*, qui maintient son statut d'espèce, et *alexandraeshingarevi* un synonyme junior de *An. maculipennis*.

Vers le début des années 1980, une autre technique d'analyse, électrophorèse des isoenzymes, a contribué à des changements significatifs dans la taxonomie du groupe *maculipennis*. Bullini *et al.*, (1980) ont révélé la présence d'une nouvelle forme d'*An. subalpinus* et considèrent *An. sicaulti* comme une "variété géographique" d'*An. labbranchiae*. Ces résultats ont été soutenus par Cianchi *et al.*, (1981), qui ont montré l'existence des preuves enzymatiques compatibles avec l'isolement reproducteur entre les populations sympatriques d'*An. subalpinus* et *An. melanoon*.

De nouvelles méthodes moléculaires basées sur l'amplification de l'ITS2 (internal transcribed spacers) ont vu le jour. Les premières études étaient basées sur l'utilisation des amorces des gènes ITS2 de l'ADN ribosomal (Proft *et al.*, 1999). Elles s'appuient sur les différences interspécifiques dans les séquences ITS2 et la mobilité relative des hétéroduplexes formés entre une séquence connue ITS2 et l'ADN ribosomal inconnu. Les résultats émanant de ces études sont très prometteuses et ont permis l'identification de six espèces jumelles: *An.*

*atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. melanoon*, *An. sacharovi* (Romi *et al.*, 2000). Ces résultats n'ont pas été affirmés par Marinucci *et al.*, (1999) qui ont déterminé la séquence du gène ITS2 de l'ADNr des sept espèces du complexe *maculipennis*. Les résultats de leurs études ont montré un polymorphisme intraspecific faible et une relation phylogénétique entre les différents membres du complexe.

L'introduction de la PCR comme méthode d'identification génétique a apporté des réponses claires et a nettement améliorée les connaissances relatives à la taxonomie du groupe *Maculipennis*. Ainsi, Linton *et al.* (2002a), ont développé une variante de la PCR dite PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). L'analyse des séquences obtenues par amplification de la région ITS2 de l'ADN a permis une caractérisation fine et complète des différents membres du complexe *maculipennis* avec l'identification d'*An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. melanoon* / *subalpinus*. d'*An. subalpinus* et *An. melanoon*. Ces deux dernières espèces étaient jusqu'alors non différenciables (conspécificité). En suivant la même approche scientifique et grâce au séquençage de la région ITS2 de l'ADN ribosomiale des moustiques collectés des provinces d'Iran, Sedaghat *et al.*, (2003a), ont identifié une nouvelle espèce du complexe. Il s'agit d'*An. persiensis* ; une espèce qui ressemble morphologiquement à d'autres espèces du membre d'*An. maculipennis*, notamment *An. martinius* et *An. sacharovi*. Bien qu'elle soit différente du point de vu morphologique, le séquençage de la région ITS2 de l'ADN nucléaire a permis de distinguer cette espèce des autres membres du complexe *maculipennis*. *An. Persiensis* est plus proche d'*An. martinius* (93,2% de similitude) que *An. sacharovi* (85,7% de similarité).

En outre, un nouveau membre du complexe a été identifié en 2004 nommé *An. daciae* par Nicolescu *et al.* Il a été collecté dans la région côtière de la mer Noire et les plaines adjacentes à la rivière dans le sud du Danube en Roumanie. Il a été découvert à travers le séquençage de la région ITS2 de l'ADNr. Cet anophèle est génétiquement et morphologiquement très proche d'*An. messeae*, il a été souvent en sympatrie avec ce dernier (Nicolescu *et al.*, 2004). En 2005, *An. artemievi* a été décrite pour la première fois au Kirgystana par Gordeev *et al.*; en termes de morphologie, elle constitue l'espèce jumelle d'*An. sacharovi* et *An. martinius*. Cependant l'analyse de la séquence de la région ITS2 de l'ADNr a montré qu'elle est plus semblable à *An. maculipennis*, avec 91% d'homologie, et *An. martinius*, avec 87% homologie avec (Gordeev *et al.*, 2005).

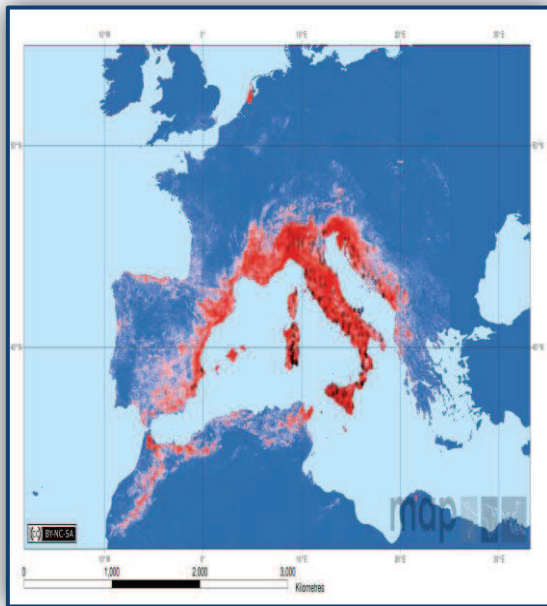
Aujourd'hui, le complexe *Anopheles maculipennis* est composé de 12 espèces Paléarctiques nommées *An. artemievi*, *An. atroparvus*, *An. daciae*, *An. beklemishevi*, *An. labranchiae*, *An. lewisi*, *An. maculipennis*, *An. martinus*, *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. persiensis* et *An. sacharovi* (White 1978 ; Linton *et al.*, 2002a, Boccolini *et al.*, 2003 ; Nicolescu *et al.*, 2004 ; Sedaghat *et al.*, 2003a ; Gordeyev *et al.*, 2005).

### **V-2 Importance médicale et répartition géographique du complexe *Anopheles maculipennis***

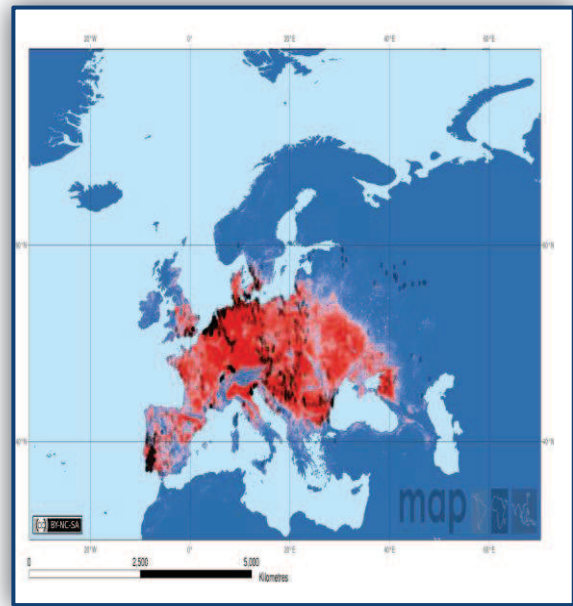
L'importance médicale du complexe *Anopheles maculipennis* réside dans le rôle vecteur de ses espèces dans la transmission du paludisme. Du point de vue répartition géographique, chaque espèce possède un air de distribution bien délimitée:

\* *An. labranchiae*, est une espèce principalement côtière et limitée dans le sud de l'Europe, la Croatie (Adamovic, 1984; 1986a), la France (Hackett et Missiroli, 1935; Coluzzi. et Sabatini, 1995). Elle se trouve réparti le long de la Méditerranéenne occidentale, à l'est jusqu'à la Yougoslavie, au nord jusqu'aux Pyrénées et les Alpes, Corse et l'Afrique du Nord (Grjebine *et al.*, 1976 ; Becker *et al.*, 2010)( figure 11). Elle est la principale espèce reconnue comme vecteur du paludisme autour du bassin méditerranéen en occurrence au Maroc, au Portugal, en Roumanie et en Italie.

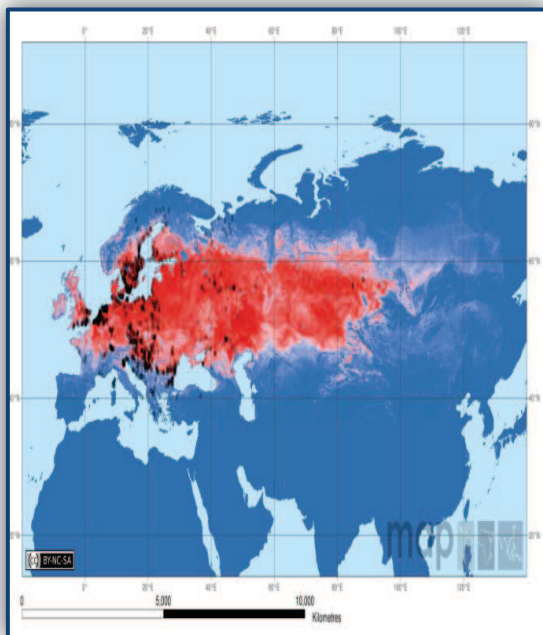
\* *An. atroparvus* vecteur responsable de la transmission du paludisme en Grande-Bretagne, France, Hollande, Espagne et Portugal (Bates in Boyd 1949 ; Linton *et al.*, 2002b). Il est très largement répandu sur le littoral méditerranéen, depuis la côte jusqu'à l'étage subalpin, (Rioux 1958). *An. Atroparvus* a une distribution inégale au nord et au centre de l'Italie en traversant le sud-ouest de la Russie et la zone côtière de la mer noire en Sibérie et la Macédoine (figure 11). Cet anophèle est toujours présente et maintient un risque de reprise de la transmission du paludisme (Romi *et al.*, 1997).



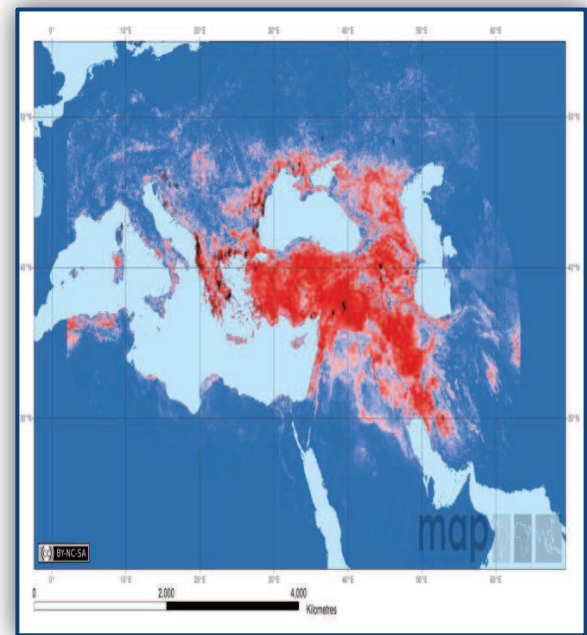
A



B



C



D

**Figure 11 :** Distribution géographique d'*An. labranchiae* (A), *An. atroparvus* (B), et (C) *An. messae* (D) *An. sacharovi* (Sinka et al., 2010)

\* *An. sacharovi* est une espèce largement distribuée au sud de l'Europe et à l'est de l'Asie y compris le nord de Tadjikistan (Keshishyan 1941) (figure 11). C'est une forme du Proche-Orient qui se trouve en Europe dans les Balkans et sur la côte de l'Italie. Il est considéré comme le vecteur le plus important du paludisme dans l'ancienne Union soviétique, les Balkans (Zahar, 1990), la Turquie et le nord de la Grèce (Haqjinicolaou et Betzios, 1973; Ramsdale et Haas, 1978 ; Kasap, 1990 ; Ouzounis et Samanidou-Voyadjogou, 1993 ; Alten *et al.*, 2000). Il a été considéré comme vecteur potentiel de la maladie au sud d'Europe (Romi et al, 1997; Ramsdale et Snow, 2000), en Eurasie, y compris le nord de l'Iran et sur son plateau central (Jetten et Takken, 1994; Oshaghi *et al.*, 2003 ; Djadid *et al.*, 2007) et en Arménie (Romi *et al.*, 2002) (figure 11).

\* *An. messeae* est une espèce continentale (Bates et Hackette, 1939) qui a été signalée dans différentes régions du nord de l'Europe, l'Europe centrale et le nord d'Asie (Grjebine *et al.*, 1976). Elle a été impliquée dans la résurgence du paludisme en Russie et en Ukraine (Nikolaeva, 1996)( figure 11). Cet anophèle est considéré comme un vecteur du paludisme en Europe de l'Est, notamment en Roumanie, Russie et Asie occidentale (Zotta, 1938 ; Bruce-Chwatt et De Zulueta, 1980; Nikolaeva, 1996), mais il n'est pas considéré comme un vecteur au nord-ouest de l'Europe (Jetten & Takken, 1994), ce moustique a été incriminé comme vecteur secondaire dans les plaines de la Turquie (Alten *et al.*, 2000).

\* *An. maculipennis* a été rapportée comme vecteur secondaire en Turquie (Alten *et al.*, 2000) et comme vecteur principal du paludisme en Iran et sur le littoral de la mer Caspienne (Jetten and Takken, 1994; Oshaghi *et al.*, 2003). *An. maculipennis s.s.* couvre la plus grande partie de l'Europe en occurrence au nord de l'Europe (Allemagne, France) au sud de l'Espagne, la grande partie de la Russie, de la Scandinavie et le nord de l'Asie centrale (Grjebine, 1976 ; White, 1978) (figure 12).

\* *An. melanoon* est un moustique largement réparti en : Europe du Sud (White, 1978), et Asie centrale. Cette espèce a été trouvée en sympatrie avec *An. maculipennis* dans Burdur-Karakoy, le nord des montagnes de Taurus (Akiner et Caglar, 2010), en Grèce (Linton *et al.*, 2007), en Roumanie (Nicolescu et al, 2004), dans le sud de la France (Saliers *et al.*, 1978), la France continentale et en Corse (Moussiegt, 1986; Schaffner, 1998)( figure12). Toutefois, Concernant *An. melanoon*, il n'existe aucune preuve montrant le rôle de cet anophèle dans la transmission du paludisme (Sedaghat et Harbach, 2005).



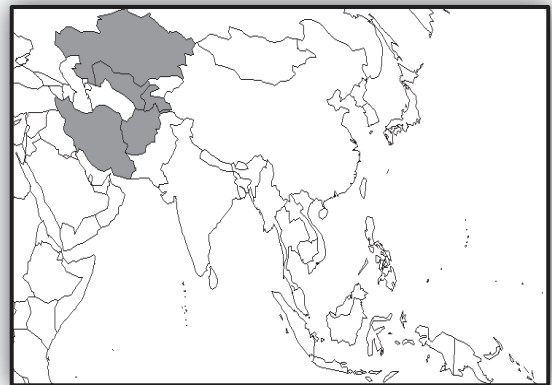
*An. maculipennis*



*An. melanoon*



*An. beklemishevi*



*An. martinus*



*An. lewisi*

**Figure 12** : distribution géographique d'*An. melanoon*, *An. beklemishevi*, *An. lewisi*,  
*An martinus* et *An. maculipennis* ss

(Source : [www.diptera-culicidae.0catch.com/subgenus\\_anopheles.html](http://www.diptera-culicidae.0catch.com/subgenus_anopheles.html))

\* *An. beklemishevi* est espèce endémique au nord de la Russie et les pays baltes (White, 1978), dans le nord de la Sibérie, de la Suède et de la Finlande (Korvenkontio *et al.*, 1979 ; Jaenson *et al.*, 1986) et elle est également enregistrée dans plusieurs localités du sud de la Finlande (Utrio 1979). Son aire de répartition se limite au Nord et à l'Est de l'Europe (figure 12). Jusqu'à présent, peu de données ont été rapportées sur la biologie et le comportement d'*An. beklemishevi*. L'espèce n'a, très probablement, joué aucun rôle dans la transmission du paludisme jusqu'à présent.

\* *An. persiensis* est collecté seulement au nord de la mer Caspienne, et dans les provinces de Gilan et Mazandéran en Iran (Sedghat *et al.*, 2003). Cependant, il est susceptible d'avoir une distribution beaucoup plus large, car il est très fréquent dans ces provinces. *An. persiensis* a été trouvé en sympatrie avec *An. maculipennis* dans la province de Gilan, et avec *An. maculipennis* et *An. sacharovi* dans la province de Mazandaran. Cependant, son implication dans la transmission du paludisme dans le nord de l'Iran, qui a été attribué à *An. maculipennis*, ne peut pas être écartée (Sedaghat *et al.*, 2003a ; 2009).

\* *An. daciae* a été signalé sur la côte de la mer noire dans le sud de la Roumanie et en Grande Bretagne (Nicolescu *et al.*, 2004 ; Linton *et al.*, 2005). Toutefois, peu de recherches ont été réalisées pour confirmer le statut d'*An. daciae* et éclaircir sa compétence vectorielle, la survenance d'*An. daciae* dans une région donnée peut avoir un impact sur l'épidémiologie des maladies transmises par les moustiques (Kronefeld *et al.*, 2012).

\* *An. artemievi* a été identifié dans Tienshan sur la base d'études morphologiques cytogénétiques et moléculaires (Gordeev *et al.*, 2008). Cet anophèle est trouvé dans des échantillons collectés en Turkménistan (Zvantsov *et al.*, 2010). Récemment, cette espèce a été retrouvée au nord du Tadjikistan à des altitudes allant jusqu'à 1200 m (Habirov *et al.*, 2012). *An. artemievi* est soupçonné impliqué dans la transmission du paludisme dans la région de Fergana en Russie.

Toutefois, jusqu'à présent, aucune donnée sur le rôle d'*An. lewis* et d'*An. martinius* dans la transmission du paludisme n'a été signalé. *An. lewis* décrit pour la première fois en Sibérie puis en Espagne, au nord de l'Italie et tout au long des Balkans (Bates, 1940) (figure 12) tandis que *An. martinius* a été décrite comme une nouvelle espèce d'anophèle collectée au Turkestan à Tashkent en Ouzbékistan. Récemment, *An. martinus* a été répertorié par Gordeev *et al.*, (2006) à partir des échantillons collectés de la rivière de la vallée d'Amudarya en Russie (figure 12).

## **VI- METHODES D'IDENTIFICATION DES ESPECES ANOPHELIENNES**

L'identification précise des espèces anopéliennes reste un problème essentiel à résoudre, pour une meilleure compréhension de leur rôle potentiel dans la transmission du paludisme ainsi que pour l'amélioration de l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle (Manguin *et al.*, 2001). Des techniques essentiellement basées sur les différences morphologiques, cytogénétiques, iso-enzymatiques et moléculaires ont été développée pour répondre à cet objectif.

### **VI-1 Méthodes morphologiques**

Classiquement, l'identification des anophèles repose sur des caractères morphologiques et l'emploi de clefs de détermination établies pour chaque grande région zoogéographique. La morpho-taxonomie classique, initialement compliquée par la nécessité de la connaissance de la nomenclature des soies et des plaques, a reçu un regain d'intérêt avec l'apport de l'informatique qui a permis la réalisation de CD-ROM, comme celui de la détermination des anophèles d'Afrique tropicale (Hervy *et al.*, 1998) et d'Europe (Schaffer *et al.*, 2001). Cette méthode bien qu'elle reste la méthode de base, elle ne s'applique évidemment pas aux espèces jumelles.

### **VI -2 Méthodes cytogénétiques**

Le principe de cette technique est basé sur l'observation et l'étude des chromosomes polythènes (Carnevale et Robert, 2009). Toutefois, cette méthode présente des contraintes dont on peut citer : la contrainte de travailler sur des stades de développement spécifiques frais, congelés ou fixés ; La non application de cette méthode chez tous les anophèles car certains ne possédant pas de chromosomes polythènes avec des bandes distinctes (Hunt *et al.*, 1998 ; Somboon *et al.*, 2001). Enfin, la préparation des chromosomes est longue et fastidieuse, et la lecture des bandes requiert une grande expertise.

### **VI- 3 Méthodes iso-enzymatiques**

Cette technique est basée sur la mobilité électrophorétique de certaines enzymes due au polymorphisme des séquences d'acides aminés. Ces différentes formes alléliques sont appelées isoenzymes. Sur gel d'amidon ou d'acétate de cellulose, lors d'une électrophorèse, à un pH donné, ces allèles peuvent migrer différenciellement. Certains allèles s'avèrent spécifiques d'une espèce et peuvent être utilisés comme marqueurs d'identification. L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne s'applique qu'à du matériel vivant ou congelé à l'état frais (Miles, 1979).

## VI -4 Méthodes moléculaires

Le développement des techniques d'amplification de l'ADN depuis les années 1990 a pris le pas sur toutes les autres techniques d'identification d'espèces. Ceci est dû à leur usage facile, à leur sensibilité, fiabilité et leur rapidité. De plus, ces outils s'appliquent sur n'importe quel stade de développement, utilisent des spécimens simplement conservés à l'état sec ou dans l'éthanol.

### VI-4-1 Principe de la PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

#### a- Les réactifs de la PCR

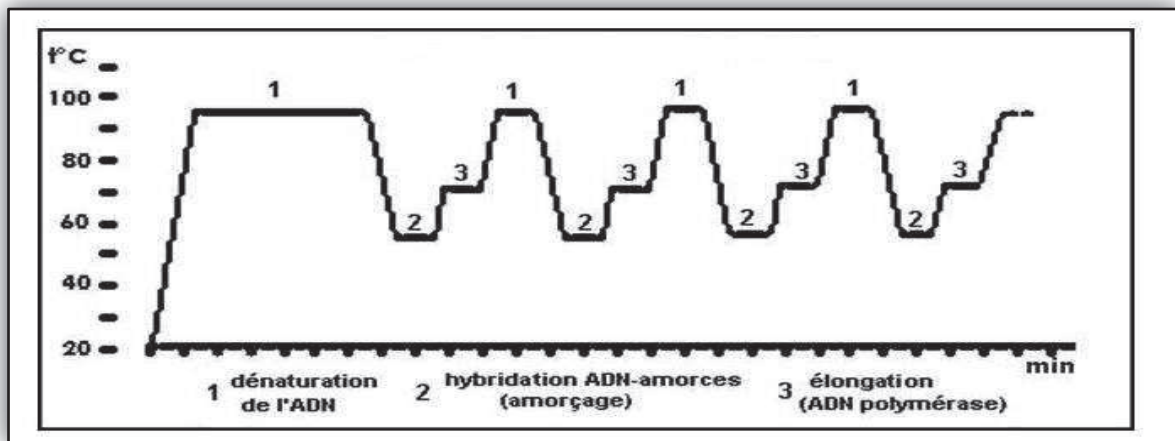
Le mélange des différents réactifs de la PCR est appelé « master mix » ou mélange réactionnel qui doit contenir :

- Les amorces ou oligonucléotides (primers), ce sont des polymères nucléotidiques, de 10 à 30 paires de base de séquences spécifiques du gène à amplifier, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire.
- Une enzyme permettant la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification. L'enzyme utilisée est la *Thermus Aquaticus polymerase* (Taq). Taq polymérase une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.
- 4 nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (*DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates*), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.
- MgCl<sub>2</sub>, les ions magnésium sont importants dans la PCR, ils influent sur l'activité enzymatique de la Taq.
- Un tampon: le tampon 10X est souvent utilisé, il contient en général du Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> (15mM), pH8.7.

### b- Principe de l'amplification

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes (figure 13):

- Dénaturation : Séparation des brins de l'échantillon d'ADN par chauffage entre 90°C et 95°C.
- Hybridation : les amorces se fixent sur l'ADN monobrin à la température d'hybridation requise (entre 55°C et 68°C).
- Elongation : La Taq polymérase va synthétiser le brin complémentaire à partir de l'amorce en utilisant les dNTP, ce qui permet de doubler l'ADN cible. Cette étape se déroule à 72°C. Chaque cycle ainsi répété permet d'aboutir à un ADN cible multiplié exponentiellement par  $2^n$  (n= nombre de cycles).



**Figure 13:** Schéma des étapes d'amplification par PCR (Thiele, 1990 ; Smyth, 1992).

### c-L'électrophorèse

Pour visualiser le résultat de l'amplification on procède à l'électrophorèse qui permet la migration des bandes d'ADN dans un gel d'agarose selon leur poids moléculaire sous un champ électrique.

L'utilisation de l'agarose permet d'induire un effet de tamisage moléculaire. A pH 7, les acides nucléiques sont chargés négativement en raison des groupements phosphates: ils migrent donc vers l'anode (électrode +) en fonction de leur poids moléculaire, plus le fragment est petit, plus il migrera loin. L'addition de Bromure d'Ethidium (BET), produit intercalant des bases nucléiques, directement dans le gel permettant de visualiser l'ADN en fin d'électrophorèse. La taille des fragments d'ADN amplifiés est estimée grâce à un marqueur de taille présent sur le même gel.

#### VI-4-2 Différentes méthodes d'identification moléculaire

La biologie moléculaire s'est constamment enrichie d'une pléiade de techniques, dont le point commun reste l'étape de la PCR. Parmi ces techniques les plus employées pour l'identification du groupe d'anophèles. On peut citer les types suivants :

\* **La PCR-RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) comprend l'amplification du gène suivie de sa digestion par une enzyme de restriction. L'identification des différents *taxa* est faite grâce au polymorphisme de la région d'ADN ciblée, révélée par l'endonucléase, et résultant en des profils de digestion différents.

\* **La PCR -SSCP** (*Single Strand Conformation Polymorphism*) nécessite une deuxième étape de dénaturation par la chaleur des produits PCR, qui sont ensuite refroidis très rapidement afin de générer la formation de structures secondaires d'ADN monobrin. Ces formations migrent de manière différentielle en fonction de leur taille et de leur conformation, liées au polymorphisme de la région ciblée.

\* **La PCR -AS (A Specific-PCR)**: La généralisation du séquençage partiel ou complet de nombreux génomes a permis le développement de tests d'identification en une seule étape de type allèle - spécifique (AS-PCR ou PASA-PCR). C'est une technique la plus développée actuellement, très spécifique qui permet de tester rapidement un grand nombre de spécimens, et même si sa mise au point n'est pas toujours aisée.

\* **La PCR -RAPD** (*Random Amplified Polymorphism DNA*). L'identification aléatoire de fragments spécifiques peut être réalisée avec des amorces de type RAPD, décimètres (10 nucléotides) et arbitraires, c'est-à-dire provenant de différentes régions du génome. Cette méthode a aussi été utilisée dans l'analyse de génétique des populations et avec plus ou moins de succès pour l'identification d'espèces cryptiques chez les anophèles (Sucharit et Komalamisra, 1997).

\* **La PCR-AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Un autre moyen de sélectionner des fragments de type espèce - spécifique pourrait être l'utilisation des régions criblées à partir de fragments AFLP. Le principe de base est l'amplification secondaire de fragments de restriction de l'ADN génomique auxquels des adaptateurs, servant de sites d'hybridation des amorces, ont été fixés. Deux amplifications sont nécessaires. La première, universelle, amplifie tous les fragments de restriction. La seconde utilise des amorces ayant en extrémité 3', une base supplémentaire sélective.

\* **La PCR-DAF** (DNA amplification fingerprinting): cette technique utilise une amorce unique et courte (environ 5 paires de bases) de séquence arbitraire, elle permet d'obtenir des spectres d'ADN de complexité variable constituant l'empreinte digitale génétique d'un spécimen donné.

\* **La PCR multiplex**. Lorsque les amorces de plusieurs espèces sont combinées dans une même réaction d'amplification, on parle alors de PCR multiplexe. Le principe de la PCR multiplex est basé sur l'amplification, en un seul tube ou réaction, de plusieurs fragments d'ADN différents (au moins deux) (Ameziane *et al.*, 2006). Cette technique a pour avantage de réduire le coût du test et de diminuer le temps d'exécution. Toutefois, Malgré sa spécificité et sa sensibilité, la mise au point d'une PCR multiplex est plus difficile qu'un PCR simplex, cette difficulté est liée à tous les ingrédients nécessaires à la co-amplification multiple comme les différents couples d'amorces qui, amplifiés ensemble peuvent être à l'origine de la formation de bandes parasites fréquemment observés sur gel d'agarose lors de mise au point non optimisées, Cependant, les contaminations constituent de sérieux handicaps pour l'application de la PCR comme technique de routine.

#### \* **le Séquençage de l'ADN**

##### **a-Définition**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. Les marqueurs nucléotidiques nucléaires (ITS1,ITS2, microsattellites,...) et mitochondriaux (COI, COII, COIII, cytochrome b...) sont utilisés dans le règne animal pour des études phylogénétiques, démographiques, biogéographiques et phylogéographiques. Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable mais reste néanmoins coûteuse.

##### **b- Marqueurs nucléotidiques**

###### \* **ADN ribosomal**

L'ADN ribosomal (ADNr) a été décrit comme étant une bonne base pour des études systématiques des complexes d'espèces d'Anophèles, (Collins et Paskewitz, 1996). L'ADNr est constitué de répétitions d'unités transcriptionnelles identiques entre elles. Chacune de ces

unités est constituée de 3 régions codantes (18S, 5.8S et 28S) et de 2 régions non-codantes appelées « Internal Transcribed Spacer » (ITS-1 et ITS-2).

Ces ITS 1 et 2 sont très utilisés chez les moustiques vecteurs du paludisme pour étudier les différences génétiques (Gentile *et al.*, 2001, 2002) ; mais également pour la caractérisation moléculaire en vue de diagnostic (Kengne *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2003; Van Bortel *et al.*, 2000).

#### \* ADN mitochondriale

L'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) mitochondriale est considéré comme un détenteur de l'information génétique impliquée dans les mécanismes héréditaires (Crick, 1970). Le génome mitochondrial présente plusieurs particularités qui en font un outil de choix pour réaliser des identifications génétiques, des études de phylogénies ou de génétique de populations sur des périodes relativement brèves. Parmi ces particularités on peut citer :

- l'ADN mitochondrial suit une hérédité cytoplasmique (ou non mendélienne). Les mitochondries sont présentes en nombre variable dans le cytoplasme des cellules, l'amplification des gènes est ainsi facilitée.
- l'ADN mitochondrial est caractérisé par l'absence de recombinaison (Olivio *et al.*, 1983). Etant donné que le génome mitochondrial est haploïde, aucune recombinaison par *crossing-over* n'intervient lors de la méiose
- L'abondance de l'ADN mitochondrial par cellule. Chaque cellule peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de mitochondries, elles-mêmes renfermant entre 1 à 10 copies d'ADN mitochondrial (Bogenghagen et Clayton, 1974).
- l'ADN mitochondrial (ADNmt) est plus polymorphe que l'ADN ribosomale. Les mitochondries sont en grand nombre dans le génome, l'amplification des gènes est ainsi facilitée. L'héritabilité du génome mitochondrial est maternelle et la recombinaison absente (Simon *et al.*, 1994 ; Hwang et Kim, 1999). Ainsi, l'ADN mitochondrial est informatif sur l'histoire de la lignée matriarcale et peut permettre la mise au jour de phénomènes d'introgression. Les gènes mitochondriaux sont donc des marqueurs de choix dans les phylogénies et sont utilisés en phylogéographie.

DEUXIEME PARTIE:  
PARTIE PRATIQUE

## **CHAPITRE I : PRÉSENTATION DU MILIEU, MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **I- PRÉSENTATION DES RÉGIONS D'ÉTUDE**

Plusieurs critères ont été pris en compte pour le choix des régions d'études: le passé épidémiologique de ces régions dans la transmission du paludisme, l'existence d'un grand nombre de sites potentiels de reproduction des moustiques et la présence d'une population humaine très mobile. Les données géographiques de chaque région sont présentées dans le tableau 3.

#### **I-1 Caractérisation moléculaire du complexe *Anopheles maculipennis***

##### **I-1-1 Régions d'études au Maroc**

Actuellement, le Maroc compte 16 régions rassemblant 75 préfectures ou provinces, qui regroupent 1503 communes. Les informations sur nos 08 provinces d'étude marocaines et 01 algérienne (figure : 14 ; 15 et 16) sont rapportées dans les sites ci-dessous (1).

##### **a- Province de Tétouan**

La Province de Tétouan est située au Nord du Maroc. Elle est limitée au nord par les préfectures de Fahs-Anjra et M'diq Fnideq, au sud par la Province de Larache et la Province de Chefchaouen, à l'est par la Méditerranée et à l'ouest par la Province de Tanger - Asilah. La Province de Tétouan s'étend sur une superficie de 3067 km<sup>2</sup>. Sa population est de l'ordre de 517.339 habitants (RGPH, 2004). La Province de Tétouan possède un climat de type méditerranéen, chaud et sec en été et frais et humide en hiver. La zone enregistre en général un cumul pluvial annuel moyen d'environ 700 mm au niveau du littoral à plus de 2000 mm dans les sommets montagneux.

##### **b- Province de Tanger**

Cette province est située à l'extrémité nord du pays, la ville est la principale porte du Maroc sur l'Europe, dont elle est séparée par les 14 km du détroit de Gibraltar. La superficie de la Province de Tanger est de 1.195 km<sup>2</sup> et la population s'élevait à 669 685 habitants (RGPH, 2004). Tanger est aussi la seule ville qui donne sur l'Océan Atlantique et la mer méditerranée. Le climat de Tanger est de type méditerranéen tempéré par l'influence océanique et le souffle du chergui, présentant des saisons bien marquées : hiver doux et humide, été tiède et sec, intersaisons modérément pluvieuses. Les précipitations sont comprises entre 700 et 1000 mm par an.

1:[http://www.apdn.ma/index.php?option=com\\_content&view=article&id=99%3Afahs&catid=43%3Acarte-geographique-apdn&lang=fr](http://www.apdn.ma/index.php?option=com_content&view=article&id=99%3Afahs&catid=43%3Acarte-geographique-apdn&lang=fr) (<http://fr.wikipedia.org/wiki>); ([http://www.drarszz.gov.ma/files/Monographie\\_de\\_la\\_region\\_Rabat\\_Sale\\_Zemmour\\_Zear.pdf](http://www.drarszz.gov.ma/files/Monographie_de_la_region_Rabat_Sale_Zemmour_Zear.pdf)) ([www.ads.ma](http://www.ads.ma)).

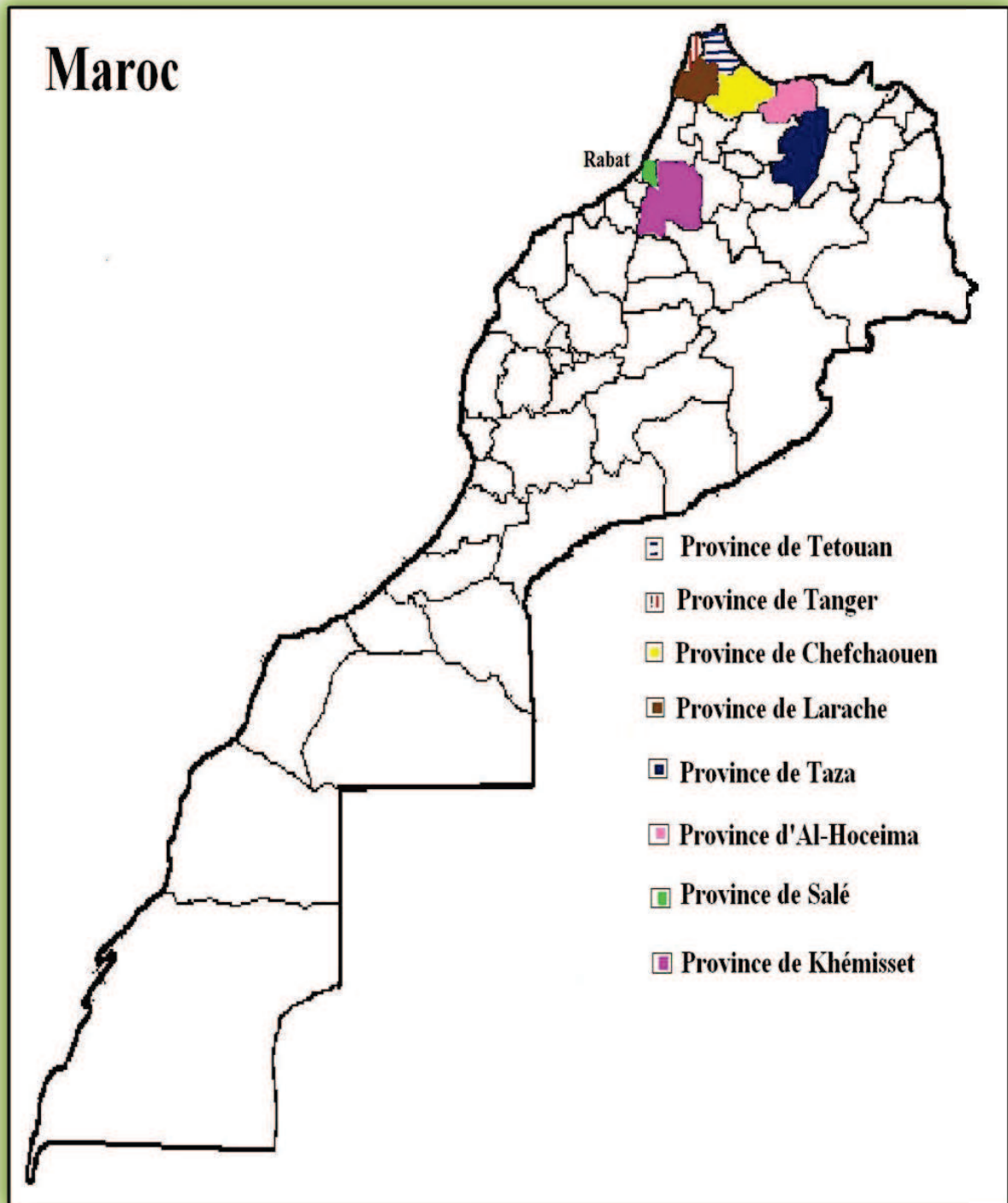


Figure 14 : Les sites d'études au nord du Maroc

**c- Province de Larache**

Cette province est située dans le nord du pays sur la côte de l'Atlantique. Elle est limitée, au Nord par la Province de Tétouan et la Province de Tanger-Asila, au Sud par la Province de Kenitra, à l'Est par la Province de Chefchaouen et à l'Ouest par l'Océan Atlantique. Sa superficie est de 2783 km<sup>2</sup>. La population de la province est de 472 386 habitants (RGPH 2004). La Province de Larache bénéficie d'un climat océanique caractérisé par l'alternance d'une saison humide et fraîche, d'octobre à avril, et d'une saison un peu chaude, de juin à septembre. La pluviométrie moyenne annuelle varie entre 800 et 1000 mm et elle est concentrée dans sa quasi-totalité entre octobre et juin.

**d- Province de Chefchaouen**

Cette province est située au Nord-Ouest du Maroc sur la chaîne rifaine, elle est limitée au Nord par la mer méditerranée sur une longueur de 120 km, au Sud par les provinces de Taounate et Sidi kacem, à l'Est par la province d'Al-Hoceima et à l'Ouest par les provinces de Tétouan et Larache. La Province de Chefchaouen s'étend sur une superficie de 4350 km<sup>2</sup> avec une densité d'environ 121 habitants par Km<sup>2</sup>. Sa population s'élevait à 524 602 habitants (RGPH, 2004). Cette Province est caractérisée par trois variétés de climat: climat typiquement méditerranéen dans la zone montagneuse, pluvieux et froid en hiver et doux en été. Les précipitations y sont les plus importantes et varient entre 800 et 1 400 mm/an atteignant parfois 2 000 mm/an. Un climat semi-aride qui domine la zone côtière avec des précipitations qui varient entre 300 et 400 mm/an et la zone sud est caractérisée par un climat humide en hiver et sec en été avec des précipitations oscillant entre 900 et 1 300 mm/an.

**e- Province de Salé**

La province de Salé est située dans la région Rabat-Salé-Zemmour-Zaër. Elle est située sur le littoral atlantique du pays, sur la rive droite de l'embouchure du Bouregreg, en face de Rabat. Elle est limitée à l'est par la province de Khémisset, au sud par la préfecture de Rabat, à l'ouest par l'océan Atlantique et au nord par la province de Kenitra. La superficie de la préfecture de salé est de 672 km<sup>2</sup>. Selon le recensement général de la population et de l'habitat de 2004, la population de salé est un peu près 800 000 habitants. Ce qui fait d'elle la deuxième ville la plus peuplée au Maroc après Casablanca. Le climat est de type méditerranéen à influence océanique, du fait de son emplacement sur la côte atlantique. Cette Province appartient au domaine bioclimatique sub-humide avec des variations semi-arides et humides. La précipitation moyenne varie entre 500 et 600 mm/an.

### f- Province de Khémisset

La province de Khémisset fait partie de la zone économique centre ouest du Royaume. Ses limites territoriales sont au Nord: la province de Kénitra et Sidi Kacem. A l'Ouest : la wilaya de Rabat - Salé, à l'Est la wilaya de Meknès et au Sud les provinces de Khouribga et de Khénifra. Cette zone couvre une superficie de 7783 km<sup>3</sup>. La population est aux environs de 105 088 (RGPH, 2004). En général, le climat de Khémisset est de type continental très chaud en été, assez froid en hiver. La pluviométrie se situe entre 400 et 600 mm /an.

**Tableau 3 : Régions d'études et leurs coordonnées**

Pays	Provinces	Secteurs	Localités	Coordonnées géographiques
Algérie	El Tarf	El Kala	Douar Tonga	36°51'N, 08°30'E
Maroc	Chefchaouen	Bab Berrad	Amzegane	34°55'N, 04°53'W
	Khémisset Larache	Roumani	Ait Hamousghir	33°17'N, 06°30'W
		Kasba,	Beggara	35°11'N, 06°09'W
		Laouamra	Boucharen	35°07'N, 06°04'W
	Taza	Oued imlili	Hajeb,	34°13'N, 4°01'W
		Oued imlili	Béni M'Tir	34°8'N, 4°21'W
	Tanger	Gzenaya	Gzeina	35°46'N, 5°48'W
		Chrada	Badrouine	.....
	Tétouan	Oued Laou	Sefah	34°7'N, 4°24'W
			Chroda	35°23'N, 5°10'W
Al-Hoceima	Ikaouen	Tizgharite	35°23'N, 5°9'W	
		Azib Bouflou	33°49'N, 6°04'W	
Salé	Bouknadel	Shoul	34°01'N, 6°50'W	

### g- Province de Taza

La province de Taza est bordée du Nord par la province d'Al Hoceima, au Nord-est par la province de Nador, à l'est par la province de Taourirt au Sud par celle de Boulmane et à l'Ouest par la province de Taounate et celle de Séfrou. La province de Taza se trouve sur une superficie d'environ 7 101 km<sup>2</sup>. La population s'élève d'après le recensement de 2004 à 558 399 habitants. La province de Taza est régie par un climat très diversifié ; le climat semi aride règne dans la plus grande partie de sa superficie alors dans d'autres localités de la province surtout des hautes altitudes, il y règne un climat subhumide ou humide. Les précipitations sont de l'ordre de 600 mm/an en moyenne.



**Province de Al-Hoceima**



**Province de Taza**



**Province de Larache**



**Province de Chefchaoeun**



**Province de Tanger**



**Province de Tétouan**



**Province El Tarf**

**Figure 15:** Photos des différents types gîtes larvaires ans les régions d'études

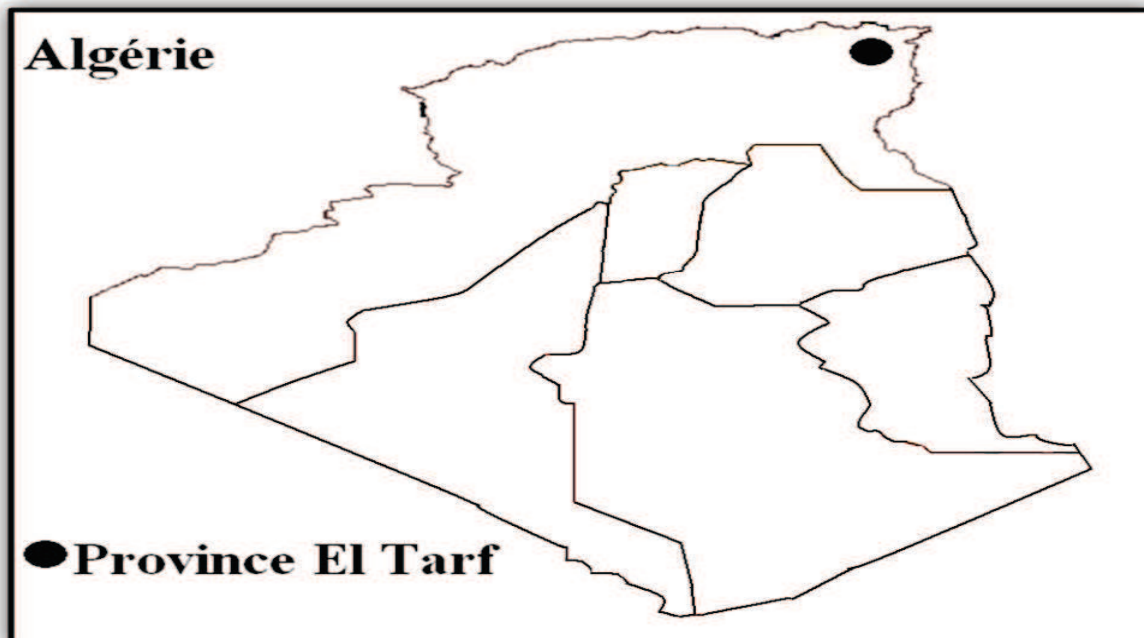
### **h- Province d'Al-Hoceima**

La province d'Al-Hoceima est située dans le Rif, chaîne montagneuse du Maroc méditerranéen. Il englobe les sites côtiers les mieux préservés de la côte nord marocaine, de hautes falaises et l'arrière-pays montagneux du Rif. Elle est limitée à l'Ouest par Chefchaouen et Taounate à l'Est par Nador, au Sud par Taza et par 120 km de côtes méditerranéennes au Nord. Elle est géographiquement située au centre nord du Maroc sur le littoral méditerranéen, avec une superficie de 3 550 km<sup>2</sup>. En 2004, d'après le recensement elle comptait 55 357 habitants. Le climat de la province de d'Al-Hoceima est de type méditerranéen : étés secs et chauds, hivers pluvieux et frais.

### **I-1- 2 Régions d'étude en Algérie**

#### **a- Province El tarf**

La province d'El Tarf est située à l'extrême nord-est de l'Algérie à la frontière tunisienne (figure 16). Elle est délimitée au nord, par la mer Méditerranée; à l'Est, par la Tunisie ; au Sud, par la wilaya de Souk Ahras ; au sud-est, par la wilaya de Guelma ; à l'Ouest par la wilaya d'Annaba. Elle est d'une superficie de 3 339 km<sup>2</sup> avec 424 419 habitants (1984). Cette région est caractérisée par un climat méditerranéen avec des étés chauds et secs (avril à octobre) et des hivers doux et humides (novembre à mars). Les précipitations annuelles varient entre 600 et 800 mm.

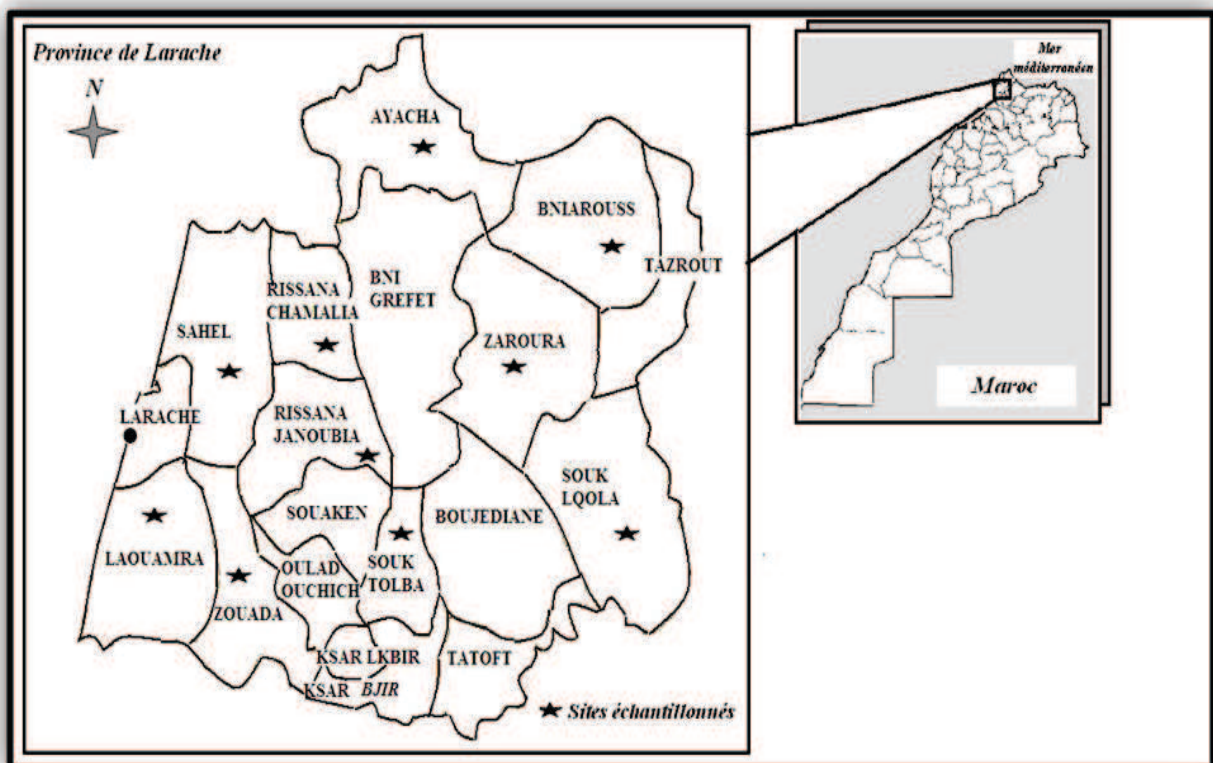


**Figure 16:** Le site d'étude en Algérie

## I-2 Caractérisation spatial d'*An labranchiae* dans la région de Larache

### I-2-1 Lieux de collectes des anophèles

Notre étude transversale a été effectuée pendant la période d'été au cours des mois de juin et juillet 2009. Les larves d'anophèles sont récoltées de 54 gîtes aquatiques appartenant à 25 localités à travers 10 secteurs de la province de Larache: *Laouamra* (35°4'N 6°5'E), *Zouada* (35°3'N 6°3'E), *Rissana chamalia* (35°12'N 5°59'E), *Rissana janoubia* (35°10'N 5°58'E), *Bniarouss* (35°18'N 5°37'E), *Ayacha* (35°23'N 5°53'E), *Zaaroura* (35°15'N 5°42'E), *Sahel* (35°16'N 6°4'E), *Souk tolba* (35°4'N 5°51'E) et *Souk lquola* (35°4'N 5°34'E) (figure 17 et 18). La distance estimée entre les gîtes et la ville de Larache est entre 10 et 120 km. Chaque habitat larvaire a fait l'objet de 10 prélèvements par la technique standard de prélèvement (WHO, 1975). Les sites ont été définis comme ayant soit une haute ou une basse densité d'anophèles. Une fiche d'enquête a été remplie au moment de prélèvement des larves de ces moustiques (Annexe 1). Sur le terrain les larves ont été conservées dans de l'alcool à 70° et transportées au laboratoire.



**Figure 17:** Régions d'étude avec les sites échantillonnés dans la province de Larache mer méditerranéen

## **II- ENQUÊTE ENTOMOLOGIQUE**

### **II- 1 Techniques d'échantillonnage**

#### **II-1-1 Echantillonnage des adultes**

L'échantillonnage est réalisé par les pièges lumineux "CDC miniature light trap" (Sudia et Chamberlain, 1962). Ces derniers se sont toujours montrés efficaces pour la capture d'*An labranchiae* (Bailly choumara, 1973).

#### **II-1-2 Echantillonnage des larves**

La récolte des les larves d'un gîte se fait à l'aide d'une louche selon une procédure standardisée pour estimer la densité larvaire (nombre de larves collectées par plongée de la louche dans le gîte).

L'équipement de base comprend (figure 18):

- une louche (environ 300 ml) de préférence de couleur blanche afin de mieux visualiser les larves avec un manche assez long permettant facilement de s'approcher et de puiser à la surface de l'eau ;
- un plateau de taille suffisante pour renverser le contenu de la louche de manière à repérer les larves, à les individualiser et à les compter ;
- des pipettes en plastique souple avec réservoir, type pasteuettes, pour prélever les larves et les mettre dans des tubes ou pots en plastique pour les transférer;
- des flacons remplis d'alcool à 70%. Dans ce dernier cas, il faut prendre soin de ne pas transvaser trop d'eau du gîte dans l'alcool.



**a**



**b**

**Figure 18 :** Matériels de collecte des anophèles : **a-** collecte des anophèles adultes par les pièges lumineux **b-** collecte des larves d’anophèles à l’aide de la louche

## **II-2 Conditionnement des anophèles**

### **II-2-1 Conditionnement des moustiques adultes**

Il est nécessaire de conditionner les moustiques adultes capturés, en vue de leur transport et d’analyse ultérieure par des tests de biologie moléculaire.

Les moustiques, encore vivants dans leurs tubes de capture, peuvent être tués au congélateur ou à l’aide de chloroforme.

Chaque moustique est identifié individuellement par un numéro unique, inscrit sur le microtube (ependorf 1,5 ml) contenant l’insecte, une couche de granulés dessiccateurs (silicagel) au fond, et une mince couche de coton. Les microtubes sont ensuite conservés au congélateur à -20°C.

### **II-2-2 Conditionnement des larves**

Les larves d’anophèles récoltées sont conservées dans des petits tubes plastiques de transport contenant de l’alcool éthylique à 70%. Nous avons seulement conservé les larves du troisième et quatrième stade pour une identification fiable.

### **II-3 Identification morphologique des échantillons**

Les anophèles récoltés ont été montés sur les lames en vue d'identification morphologique réalisée sous loupe binoculaire à l'aide d'un logiciel d'identification des moustiques de l'Afrique méditerranéenne (Brhunes et al, 2000), Les étapes d'identification sont les suivantes :

- détermination du sexe des moustiques pour ne retenir que les femelles ;
- détermination du genre de moustiques femelles.
- Les moustiques femelles de la sous famille Anophelinae sont ainsi séparés des femelles de la sous famille Culicinae (genres *Aedes*, *Culex*...).
- détermination de l'espèce d'anophèle.

### **II-4 Mesure des paramètres physico-chimiques des gîtes dans la région de Larache**

Les gîtes larvaires (rivières, marécages et rizières) (figure 19) ont été caractérisés visuellement ou à l'aide des appareils spécialisés (COMT SET, 330i/340i/ 315i, Germanie), mesurant la conductivité, la turbidité, la quantité de l'oxygène dissous et la salinité. Les relevés de la température de l'eau ont été effectués à l'aide d'un thermomètre à colonne de mercure gradué au 1/10°C. La profondeur a été mesurée à l'aide d'une barre graduée, divisée en deux classes ( $\leq$  ou  $>$  0,5 m). Le pH a été mesuré à l'aide d'un papier pH avec une précision de 1/10<sup>ème</sup>. La turbidité a été mesurée avec un turbidimètre (Orbeco analytique du système INC, (*Nephelometric Turbidity Unit*) et classée en 3 niveaux: Absence de turbidité, turbidité moyenne et turbidité élevée. La couverture végétale a été évaluée visuellement par la présence ou l'absence de plantes émergentes, la présence ou l'absence d'algues filamenteuses. La distance par rapport à l'agglomération humaine a été estimée visuellement et catégorisée en deux classes ( $\leq$  ou  $>$  100m). L'identification et la classification des plantes a été réalisée au niveau de l'institut scientifique de Rabat.

Les dix prélèvements sont effectués au bord des gîtes. L'habitat est considéré de forte densité quand les anophèles sont observés dans plus de cinq prélèvements tandis que, le gîte est défini à faible densité quand l'anophèle est observé dans moins de cinq prélèvements.



**Laouamra**



**Laouamra**



**Zouada**



**Beni arousse**



**Ayacha**



**Sahel**



**Souk tolba**



**Souk Iqola**



**Zaaroura**



**Beni arousse**



**Rissana chamalia**



**Rissana janoubia**

**Figure 19** : les gîtes larvaires des différents secteurs de la région de Larache

### III- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE MACULIPENNIS PAR LA PCR MULTIPLEX

#### III-1 Origine des échantillons

Au cours de ce travail, nous avons analysé :

- 407 anophèles sous forme de larve et d'adulte appartenant au groupe *Anopheles maculipennis* récoltés selon deux transects réalisés au cours de l'année 2007 et 2009 au niveau de 8 provinces au Nord-Ouest du Maroc : Al- Hoceima, Tanger, Tétouan, Taza, Chefchaouen, Khémisset, Salé et Larache.
- 629 larves d'anophèles appartenant au complexe *maculipennis* récoltées dans 54 gîtes aquatiques de la région de Larache en 2009.

#### III- 2 Extraction d'ADN

Pour les anophèles adultes, l'ADN a été utilisé en incorporant directement les pattes ou les ailes des moustiques dans le mélange réactionnel tandis que l'ADN génomique a été extrait des larves d'anophèles avec le kit DNeasy Tissue kit (TRIZOL) utilisé suivant le protocole du fournisseur. Cet ADN est conservé ensuite à -20°C dans des tubes de 1,5 ml.

#### III-3 Amplification de l'ADN

##### III-3-1 Choix des amorces

La cible de l'amplification est un fragment appartenant à la séquence d'insertion ITS1 qui est une séquence spécifique du complexe *Anopheles maculipennis*. Ce protocole adapté par Proft et al (1999) est capable de distinguer six membres du complexe *An maculipennis sl* avec des amorces basées sur la variation de la séquence du internal transcribed spacer (ITS2) de l'ADN ribosomale (ADNr): *An. maculipennis s.s.*, *An. atroparvus*, *An. messeae*, *An. melanoon*, *An. labranchiae* et *An. Sacharovi*. Ils sont caractérisées par la taille des amplifiants de 410 pb, 117 pb, 305 pb, 224 pb, 374 pb et 180 pb respectivement (tableau 4).

**Tableau 4 :** Amorces utilisées pour l'amplification des ITS1 de l'ADNr du complexe *Anopheles maculipennis*

Cibles	Amorces	Primer 5' – 3' sequence	Taille du primer en pb
<i>Amorce Antisens universel</i>	UN	TGTGAACTGCAGGACACATG	
<i>An. maculipennis s.s</i>	AMA	ATTTGAGGCCCATGGGCTA	410
<i>An. atroparvus</i>	AAT	CGTTTGGCTTGGGTTATGA	117
<i>An. messeae</i>	AMS	GACGCCTCACGATGACCTT	305
<i>An. melanoon</i>	AML	TGCAAGTTGAAACCTGGGGC	224
<i>An. labranchiae</i>	ALA	GTATCTCTGCTGCTATGGTC	374
<i>An. sacharovi</i>	ASA	CAAGAGATGGATGTTTTACG	180

### III-3-2 Préparation du milieu réactionnel

Les réactions d'amplification de l'ADN ont été conduites dans un volume total de 25 $\mu$ l. Les kits de PCR utilisés sont la Taq polymérase Eurogentec pour les anophèles adultes et la Taq polymérase Promega pour les larves d'anophèles.

#### a- Les anophèles adultes

Le mélange réactionnel est réalisé tel qu'il est présenté dans le tableau 5. A ce mélange réactionnel, on ajoute un échantillon : une patte ou aile d'anophèle.

**Tableau 5 :** Réaction d'amplification d'ADNr pour les anophèles adultes.

Réactifs	Volume pour une seule réaction en $\mu$ l
<i>Tampon de PCR (5<math>\times</math>)</i>	5
<i>MgCl<sub>2</sub> (1mM)</i>	1
<i>dNTPs</i>	0,5
<i>Amorce universel (UN)</i>	1
<i>Primer AMA</i>	1
<i>Primer AAT</i>	1
<i>Primer AMS</i>	1
<i>Primer AML</i>	1
<i>Primer ALA</i>	1
<i>Primer ASA</i>	1
<i>Taq polymérase (5U/<math>\mu</math>l)</i>	0,5
<i>Eau bidistillée</i>	11
Volume final	25

#### b- Les larves d'anophèles

Le mélange réactionnel est réalisé tel qu'il est présenté dans le tableau 6. A ce mélange réactionnel, on ajoute un échantillon sous forme de l'ADN extrait des larves d'anophèle.

**Tableau 6:** Réaction d'amplification d'ADNr pour les larves d'anophèles

Réactifs	Volume pour une seule réaction en $\mu$ l
<i>Tampon de PCR (10<math>\times</math>) + MgCl (25mM)</i>	5
<i>dNTPs</i>	0,5
<i>Amorce universel (UN)</i>	0,25
<i>Primer AMA</i>	0,25
<i>Primer AAT</i>	0,25
<i>Primer AMS</i>	0,25
<i>Primer AML</i>	0,25
<i>Primer ALA</i>	0,25
<i>Primer ASA</i>	0,25
<i>Taq polymérase</i>	0,125
<i>Eau bidistillée</i>	12,375
<i>ADN</i>	5
Volume final	25

### III-3-3 Programme d'amplification de l'ADN

#### a- Les anophèles adultes

L'amplification se fait à l'aide d'un thermocycleur programmable à différentes températures. Ce programme d'amplification est exécuté selon le programme du tableau 7.

**Tableau 7 :** Programme d'amplification de l'ADN pour les anophèles adultes

Stade	Température en °C	Temps	Cycle
Dénaturation préliminaire	95	2 min	1
Dénaturation	95	20 sec	35
Hybridation	53	30 sec	
Extension	72	1 min	
Extension final	72	6 min	1
Refroidissement	4	∞	

#### b- Les larves d'anophèles

Après avoir placé les tubes dans un thermocycleur, le programme d'amplification est exécuté selon trois étapes pendant 35 cycles (tableau 8).

**Tableau 8 :** Programme d'amplification de l'ADN pour les larves d'anophèles

Etapes	Température en °C	Temps	Cycles
Dénaturation préliminaire	94	5 min	1
Dénaturation	94	30s	35
Hybridation	55	30s	
Extension	72	1min	
Extension final	72	7 min	1
Refroidissement	4	∞	

### **III-4 Electrophorèse sur gel d'agarose**

#### **a- Préparation du gel**

Pour préparer le gel d'agarose 1,6%, on fait bouillir dans un ballon 1,6 g d'Agarose dans 100 ml du tampon TBE 1%. On y ajoute 0,6 µl de bromure, on mélange très bien et on met le mélange dans une microonde jusqu'à solidification. Le gel est coulé dans la plaque en verre destiné à l'électrophorèse pendant 30 min jusqu'à solidification.

Sur un morceau de parafilm, ont été déposées 2 µl de bleu de charge qui permet de maintenir l'ADN au fond du puits et de contrôler le front de migration. Ensuite, 7 µl de chaque échantillon d'ADN amplifié ont été prélevés et mélangés au bleu de charge puis déposés au fond du puits.

Un marqueur de poids moléculaire (1000pb) est déposé dans les deux puits à l'extrémité du gel, et qui migrent parallèlement à l'ADN de l'échantillon. Aussi, un témoin négatif (où l'ADN est remplacé par de l'eau bi distillée) et un témoin positif (d'espèce sous forme d'ADN d'*An. labranchiae*) sont ajoutés pour contrôler la manipulation.

#### **b- Migration**

La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 85 Volts pendant 5 minutes puis à 70 Volts durant le reste de l'électrophorèse. Celle-ci est arrêtée lorsque le témoin de migration atteint les trois-quarts de la longueur du gel (~1heure).

#### **c- Lecture du gel**

Une fois la migration est achevée, le gel est visualisé à l'aide d'un transilluminateur (Vilber louraut) à UV. Chaque fragment d'ADN amplifié donne une bande sur le gel. Les différentes bandes obtenues sont comparées à celle des différents témoins. Ceci permet de déterminer la taille des différents fragments d'ADN amplifiés. Si l'échantillon est négatif, il n'y a aucune bande de migration. S'il est positif, on observe une bande de migration qui est à la même hauteur que celle du témoin positif.

## IV- SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIALE D'*AN.LABRANCHIAE*

### IV - 1 Origine des échantillons

89 adultes d'*Anopheles maculipennis sl* collectés entre 2007 et 2008 au nord du Maroc et de l'Algérie. 79 échantillons marocains proviennent de trois régions du nord : Chefchaouen, Khémisset et Larache. Les 10 échantillons algériens proviennent de la province El Tarf, au Nord-Est de l'Algérie (à 20 kilomètres de la frontière tunisienne) collectés au mois de juin 2008. Cette partie du travail est réalisée dans le laboratoire de Systématique Moléculaire (*Natural History Museum*) à Londres.

### IV-2 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir des anophèles adultes a été effectuée en utilisant le robot d'extraction d'ADN de QIAgen® BioSprint 96 et le kit de tissu d'ADN de QIAgen® BioSprint 96, selon le protocole recommandé du fabricant, et élué en volume final de 10 µl.

### IV-3 Amplification de l'ADN

#### IV-3-1 Préparation du milieu réactionnel

Un fragment de 709 paire de bases (pb) du gène Cytochrome oxydase I mitochondrial a été amplifié avec les amorces LCO1490 (5'- GGTCACAAATCATAAAGATATTGG -3') et HCO2198 (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3') (Folmer et al, 1994). Les PCR ont été conduites dans un volume réactionnel total de 10µl. la procédure suivie est décrite dans le tableau 9.

**Tableau 9** : Réaction d'amplification dans un volume de 10µl

Réactifs	Volume pour une seule réaction en µl
<i>Tampon de PCR (10×)</i>	1
<i>MgCl (25mM)</i>	0,4
<i>dNTPS</i>	0,5
<i>Primer F (10µM)</i>	0,3
<i>Primer R (10µM)</i>	0,3
<i>Taq polymérase</i>	0,2
<i>Eau bidistillée</i>	6,3
<i>ADN</i>	1
Volume total	10

### IV-3-2 Programme d'amplification

Après avoir placé les tubes dans un thermocycleur, le programme d'amplification est exécuté selon le tableau 10.

**Tableau 10** : Programme d'amplification de l'ADNm des anophèles adultes

Étapes	Température en °C	Temps	Cycle
Dénaturation préliminaire	94	5 min	1
Dénaturation	94	30 min	34
Hybridation	48	30 sec	
Elongation	72	45 sec	
Elongation finale	72	5 min	1
Refroidissement	4	∞	

### IV-4 Electrophorèse

Deux microlitres du produit de la PCR, mélangés avec 2 µl du bleu de bromophénol. Ils ont été visualisés sur des gels d'agarose de 1%, contenant 0.5 mg/ml de bromure d'éthidium.

Des marqueurs de poids moléculaires connus sont déposés et migrent parallèlement à l'ADN de l'échantillon. Une image des bandes sur le gel est prise en l'exposant aux UV dans la chambre noire. Après avoir eu la photo du gel, le produit de la PCR est conservé à -20°C dans un tube bien étiqueté pour une purification ultérieure.

### IV-5 Purification

La purification permet l'élimination des sels, des amorces et des dNTPs qui sont présents en excès dans le milieu réactionnel. Concrètement, huit microlitres (8µl) demeurant du produit de la PCR ont été préparés en transférant dans un nouveau tube de PCR et en ajoutant 0.5 µl d'ExoSAP-IT® et 1.5 µl de l'eau bidistillée (ddH<sub>2</sub>O) par échantillon. Des tubes ont été scellés, et placés dans un Thermocycleur où les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 30 min, puis à 80°C pendant 20 min.

### IV- 6 Séquençage

Après le nettoyage de l'ADN, la concentration d'ADN a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop™ 1000. Les réactions de séquençage ont été réalisées dans les deux directions en utilisant le kit Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems, Warrington, en Angleterre). Les deux mélanges correspondant aux deux amorces sont utilisés dans un volume final de 10 µl chacun: 1 µl d'amorce, 1 µl de Big Dye (Terminator Reaction Mix) et 3µl de tampon. Après centrifugation, on ajoute 1 – 2 ng de l'ADN à séquencer dans chaque tube, en séparant toujours les deux amorces. Pour chaque échantillon, deux tubes correspondent aux deux types d'amorce.

Le programme de séquençage se déroule comme suit: un cycle de 96°C pendant 5min, suivi par 25 cycles de 96°C pendant 10 s, 50°C pendant 5 s et 60°C pendant 4min avec une phase finale de conservation à 10°C.

#### **IV-7 Analyse des données**

##### **IV-7-1 Alignement des séquences nucléotidiques**

Une bonne analyse des séquences nucléotidiques obtenues est une étape essentielle pour la fiabilité des résultats. La lecture et les corrections des séquences ont été faites sur un séquenceur ABI 3730 (PE Applied Biosystems) au laboratoire de séquençage du Natural History Museum à Londres, et les chromatogrammes résultants sont alignés en utilisant le logiciel Sequencher™ version 4.8 (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA).

L'alignement de séquences est sans ambiguïté et la génération de l'alignement de base variable a été traitée dans le logiciel MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007). La similarité avec des séquences dans le GenBank a été évaluée en utilisant le site FASTA search (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) et le Service d'identification (IDS) sur la base de données Barcode of Life (BOLD) (<http://www.boldsystems.org/views/idrequest.php>). La divergence des séquences par paires (en utilisant Kimura's 2- parameter (K2P), distance algorithmique), la détermination de la diversité des haplotypes et des tests de Chi2 ( $X^2$ ) ont été calculées dans le logiciel DnaSP 4.0 (Rozas et al, 2003). Les indices standard de variation génétique (nombre de sites polymorphes, nombre de sites informatifs et de singletons, diversité haplotypiques (Hd) ) ont été calculés par le logiciel DNAsp (Rozaset al, 2003).

##### **IV-7-2 Reconstruction de la phylogénie des haplotypes**

Afin d'estimer la fiabilité des branches internes, des méthodes statistiques sont utilisées, telles que le *bootstrapping*. On considère généralement que les branches définies par une valeur de bootstrap supérieure à 70 % sont fiables. Un arbre neighbour-joining (NJ) a été construit en utilisant les distances K2P et les bootstrap de 10000 répétitions (matrices) de données, avec graine aléatoire fixé à 70 189 dans MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007). Les espèces des groupes externes (Outgroup) ont inclus ; *An. atroparvus* de l'Angleterre, *An. melanoon* de la Grèce et *An. maculipennis ss* de l'Iran. Ces trois espèces du groupe maculipennis sont déjà rapportées dans le Genbank sous les numéros d'accèsion suivant : *An. atroparvus* (Angleterre: AF504237 et AF504238), *An.melanoon* (Grèce: AF452391 et AF452392), *An. maculipennis ss* (Iran: AY137782 et AY137783).

## **V. CARACTERISATION SPATIALE DES HABITATS AQUATIQUES DES LARVES D'ANOPHELES DANS LA REGION DE LARACHE**

### **V-1- Epidémiologie du paludisme autochtone dans la région de Larache**

La province de Larache constituait un foyer actif du paludisme, ceci est dû à plusieurs facteurs tels que la présence de rizières (principaux gîtes du vecteur), le mouvement de population et la présence de porteurs de parasites (réservoirs).

Depuis le lancement du programme de lutte contre le paludisme en 1965, la situation épidémiologique du paludisme autochtone à Larache se caractérisait par une discontinuité de la transmission locale. L'interruption définitive de la transmission a eu lieu dès l'année 1997 (Ministère de la santé, 2000).

Actuellement, la surveillance antipaludique à Larache se déploie conformément à la stratification adaptée depuis la mise en place de la stratégie d'élimination du paludisme autochtone (OMS, 2007).

### **V-2 Analyse statistique**

Les données ont été réunies dans une matrice Excel et exploitées grâce à des analyses factorielles des correspondances multiples ou AFCM (Benzecri, 1973 ; Legendre, 1984). Cette approche a permis la comparaison de la densité d'*An. labranchiae* par rapport aux différents paramètres des stations (caractéristiques des stations). Les données ont été analysées aussi par le logiciel Epi Info 2007 (version 3.4).

La matrice des données est un tableau à double entrée de 54 lignes représentant les stations et de 14 colonnes représentant les descripteurs susceptibles d'orienter la répartition des espèces anophéliennes. Les valeurs brutes des paramètres ont été représentées dans l'Annexe 3. Les classes des différentes composantes quantitatives et qualitatives, respectives aux différentes variables étudiées, sont réunies dans le tableau 11 ci-dessous

**Tableau 11** : limites des différentes composantes quantitatives et qualitatives respectives aux différentes variables étudiées

Nature de la variable	Nom de la variable	Codes	Limite de la classe	symbole de la classe
Quantitative	Profondeur (cm)	Pr	≤ 50 cm	Pr0
			> 50cm	Pr1
	pH	pH	6 - 7	Ph0
			8 - 9	Ph1
	Conductivité (µs/cm)	Cd	267 -900	Cd0
			901-2020	Cd1
	Température (°C)	T	26-29	T0
			30-36	T1
	Turbidité (NTU)	Tr	< 100	Tr 0
			100 -149	Tr 1
≥ 150			Tr 2	
Oxygène dissout (mg/l)	Od	0 - 5,98	Ox0	
		5,99 - 10,58	Ox1	
Salinité (g/l)	Sa	0-0,3	Sa0	
		0,4-0,9	Sa1	
Distance aux agglomérations humaines (m)	Dh	≤100m	Dh 0	
		> 100m	Dh1	
Qualitative	Type de gîte	Tg	Rizière	Tg0
			Marécages	Tg1
			Rivières	Tg2
	Plantes émergentes	Pem	Présence	Pem1
			Absence	Pem0
	Algues filamenteuses	Af	Présence	Af1
			Absence	Af0
	Type de plante	Tp	<i>Pas de plante</i>	Tp0
			<i>Oryza sativa</i>	Tp1
			<i>Typha dominguensis</i>	Tp2
<i>Nerium oleander</i>			Tp3	
<i>Nymphaea alba</i>			Tp4	
<i>Typha latifolia</i>			Tp5	
Densité d' <i>An. labranchiae</i>	Dal	faible	Dal0	
		élevée	Dal1	
Densité d' <i>An. cinerius</i>	Dac	faible	Dac0	
		élevée	Dac1	

## VI- TECHNIQUE D'ÉLEVAGE

Les souches sauvages femelles d'*An. labranchiae* ont été capturée de la localité de Boucharen, appartenant à la commune Laouamra qui se trouve à 18 km de la province de Larache au nord du Maroc. Les anophèles femelles ont été capturés à l'aide du piège lumineux CDC dans des écuries et à l'intérieur des maisons. Arrivées au laboratoire, les femelles ont été mises dans des cages en tulle moustiquaire. Celles qui étaient dans un état d'engorgement ont effectué leurs pontes dans des boîtes de pétri, contenant du coton couvert du papier filtre humide, mise à leur disposition.

### VI-1 Insectarium

L'insectarium (figure 20) est composé d'une salle d'élevage dont une partie est consacrée à l'élevage des larves et l'autre moitié à celle des adultes. L'insectarium est maintenu à une température de 23 - 26°C avec un taux d'humidité de 80% - 90%, et une alternance jour/nuit de 12 heures. Une variation lumineuse permet de stimuler le crépuscule. Un support humide est placé dans la cage (cristallisoir d'eau + support de papier filtre)



**Figure 20:** Photo montrant l'élevage de l'*An. labranchiae* au Laboratoire d'Entomologie Médicale, Institut National d'Hygiène, Rabat

## **VI-2 Elevage de groupe**

### **a- Obtention et conservation des pontes**

Les œufs provenant de pontes des femelles sauvages sont mis en élevage en insectarium. Ces œufs d'anophèles ne supportent pas la dessiccation. Ils sont d'abord déposés dans des pondoirs faits de papier filtre mouillés, ces œufs sont récoltés tout les matins et transférés dans des cristallisoirs de 20 cm de diamètre contenant de l'eau distillée.

La température ambiante et l'humidité relative de la salle ont été relevées quotidiennement. Nous avons noté également la température de l'eau d'incubation.

### **b- Obtention des larves**

Dès l'éclosion des œufs, les larves de stade 1 sont retirées à l'aide d'un compte-goutte et réparties par lots dans des plateaux blanc en matière plastique de 9 cm de hauteur, 35cm de longueur et de 25 cm de largeur numérotés et contenant 1,5 l d'eau distillée. Ces derniers sont rangés sur des étagères adaptées loin de toute contamination externe.

### **c- Obtention des nymphes**

Les nymphes sont recueillies chaque matin à l'aide d'une pipette pasteur et placées dans des béciers de 5 cm de hauteur et de 8 cm de diamètre à moitié remplie d'eau distillée. Elles sont déposées dans les cages des adultes. Chaque bécier a reçu exclusivement les nymphes d'un seul plateau.

### **d- Obtention des adultes**

A l'émergence, les moustiques sont placés dans des cages de dimensions 30 x 30 cm ; constitués d'une armature métallique soutenant des parois de tulle recouvertes de toile moustiquaire. Une des faces du cadre ainsi recouvert comporte une ouverture pourvue d'une manche permettant de faire passer les bras pour effectuer diverses manipulations à l'intérieur de la cage.

Nous avons réalisé pour les moustiques adultes deux types d'alimentation:

- Pour les mâles, une alimentation de maintien qui était constituée d'eau sucrée à 10 % de saccharose. Nous avons imbibé de cette solution sucrée un coton et nous l'avons posé sur la surface supérieure de la cage.
- Pour les femelles, En plus de l'alimentation du maintien, une alimentation au sang a été réalisée sur poulet, une fois toutes les 48h. Le ventre du poulet presque dépourvu de plumes était placé au-dessus de la cage pour être à la portée des moustiques.

Un cristalliseur contenant du papier filtre imbibé d'eau a été placé à l'intérieur de la cage pour servir de pondoir.

#### **e- Influence de la qualité et de la quantité de nourriture**

Des larves de stade 1 ont été réparties dès l'éclosion, dans 12 plateaux blancs contenant chacun 1,5 litre d'eau distillée. Chaque plateau a reçu 1 lot de 200 larves.

La nourriture employée pour ces larves est à base de poudre de *Tetra Baby Fish Food* et de croquettes de viande pour chat, réduites en farine et finement tamisées à raison de 0,06g pour les larves au stade 1 et 2 ; 0,12g pour le stade 3 et 4. Les plateaux contenant les larves ont été recouvert d'un morceau de toile moustiquaire pour éviter des pontes éventuelles d'autres moustiques. Nous avons procédé à des observations journalières jusqu'à l'obtention d'anophèles adultes.

### **VI- 3 Elevage individuel**

#### **a- Durée des stades larvaires**

Cet élevage a été réalisé dans 10 cristalliseurs de 11,5 cm de diamètre et 6 cm de hauteur numérotés de 1 à 10, remplis au 3/4 d'eau distillée.

Des larves de stade 1 ont été placées dès l'éclosion dans les récipients à raison d'une larve par récipient. Ces jeunes larves ont été nourries une fois par jour avec des croquettes de viande pour chat, réduites en farine et finement tamisées. Nous avons noté quotidiennement les différents stades larvaires. Ces larves ont été suivies jusqu'à l'état d'imago.

#### **VI- 4 Exploitation des résultats**

Les résultats ont été traités selon des paramètres biologiques suivants :

**a- Taux d'éclosion (Te)**

$$Te = \frac{\text{Nombre d'œufs éclos}}{\text{Nombre total d'œufs}} \times 100$$

**b- Taux de survie larvaire (Tsl)**

$$Tsl = \frac{\text{Nombre de larves de stade IV}}{\text{Nombre d'œufs éclos}} \times 100$$

**c- Taux de nymphose (Tn)**

$$Tn = \frac{\text{Nombre de nymphes obtenues}}{\text{Nombre de larves de stade IV}} \times 100$$

**d- Taux d'émergence (Tem)**

$$Tem = \frac{\text{Nombre d'adultes}}{\text{Nombre total de nymphes}} \times 100$$

**e- Taux d'inhibition de l'émergence (Tie)**

$$Tie = \frac{\text{Nombre de nymphes non écloses}}{\text{Nombre total de nymphes}} \times 100$$

**f- Rendement pré-imaginal (Rpi)**

$$Rpi = \frac{\text{Nombre de nymphes}}{\text{Nombre d'œufs éclos}} \times 100$$

**g- Rendement global (Rg)**

$$Rg = \frac{\text{Nombre total d'adultes}}{\text{Nombre total d'œufs pondus}} \times 100$$

## RESULTATS ET DISCUSSION

## CHAPITRE II : CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS

### I-PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

En entomologie médicale « l'existence des complexes d'espèces jumelles pose un très délicat problème dans la mesure où les capacités vectorielles de chacune d'entre elles peuvent être très différentes, il est donc obligatoire de connaître l'existence d'un tel complexe et de pouvoir identifier les espèces qui le constituent » (Rodhain et Perez, 1985). Cette citation montre très bien le rôle des études moléculaires dans la compréhension de l'épidémiologie des maladies vectorielles en général et du paludisme en particulier.

En effet, les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'appuyer des études morphologiques pour consolider des identifications difficiles. Ainsi, l'apport de cette discipline a permis, entre autres, de développer des outils moléculaires permettant le diagnostic précis d'espèces au sein des complexes difficiles.

*Anopheles maculipennis* *sl* est l'un des complexes les plus compliqués de point de vue taxonomique du règne animal, c'est le groupe le plus étudié car il inclut les vecteurs potentiels du paludisme en Europe, depuis les Pays-Bas jusqu'au sud de l'Italie, la Grèce et la partie européenne de l'U. R. S. S. (Guy *et al.*, 1976) en passant par les pays maghrébins : Maroc et Algérie.

Dans la région paléarctique, le groupe *maculipennis* se compose de 12 espèces morphologiquement très proches qui sont: *An. atroparvus*, *An. beklemishevi*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis ss*, *An. martinus*, *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. persiensis*, *An. daciae*, *An. lewisi* et *An. artemievi* (White, 1978 ; Linton *et al.*, 2007 ; Sedaghat *et al.*, 2003a).

Bien qu'*An. maculipennis ss*, *An. melanoon* et *An. messeae* ont été impliqués comme vecteurs principaux ou secondaires dans leurs aires de distributions respectives (Sedaghat *et al.*, 2003a ; Alten *et al.*, 2000 et Nikolaeva, 1996), les vecteurs *An. sacharovi* Favre (Hadjinicolaou et Betzios, 1973 et Sedaghat *et al.*, 2003b), *An. atroparvus* van Thiel (Jetten et Takken, 1994) et *An. labranchiae* Falleroni (Sautet et Quilici, 1971; Romi, 1999 et Romi *et al.*, 2001) restent en effet les espèces les plus compétentes dans le groupe. *An. labranchiae* soupçonné être le seul membre africain du complexe *Anopheles maculipennis*. Il est fortement abondant et répandu dans les pays du Maghreb: le Maroc (Gaud, 1953 ; Guy, 1959; Guy, 1963 ; Benmansour *et al.*, 1972 ; Faraj *et al.*, 2004), l'Algérie (Senevet et Andarelli, 1956 ; 1961) et la Tunisie (Krida *et al.*, 1998; Chahed *et al.*, 2001).

En Europe, la distribution d'*An. labranchiae* est principalement côtière et discontinue. Ce vecteur est soupçonné avoir colonisé le sud de l'Europe dans les temps historiques (Ramsdale et Snow, 2000). Il a été rapporté de la Corse (Schaffner, 1998), de l'Italie continentale; de la Sardaigne et la Sicile (Hackett et Missiroli, 1935 ; Coluzzi et Sabatini, 1995 ; Romi *et al.*, 1997; Romi, 1999) et de la Croatie (Adamovic et Paulus, 1985; Adamovic et Paulus, 1987). Malgré qu'elle a été rapporté dans les provinces d'Alicante et de Murcie en Espagne méridionale durant les années 50, cette espèce aurait disparu aujourd'hui (Blazquez et De Zulueta, 1980). Cependant, elle a été récemment détectée, grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, au nord de l'Iran (Djadid *et al.*, 2007).

*An. labranchiae* a été décrite pour la première fois sur une série de spécimens dans le marais Pontine de Rome en Italie (Falleroni, 1926). *An. atroparvus* a été longtemps considérée comme une sous-espèce de *An. labranchiae* (Bats, 1940) jusqu'à ce que son statut d'espèce distincte a été démontré (Bianchi, 1968). *An. labranchiae* avait deux synonymes connus : *An. pergusiae* Missiroli (*localité: Lac Pergusa, province d'Enna, Sicile*) et *An. sicaulti* Roubaud (*localité proche de Rabat, Maroc*). En se basant uniquement sur la morphologie des œufs, *An. pergusiae* a été initialement décrite comme une sous-espèce d'*An. maculipennis* (Missiroli, 1935). Cinq ans plus tard, ces espèces anophéliennes du complexe ont été considérées comme des exemples atypiques d'*An. labranchiae* en se basant sur la morphologie des œufs et les différences comportementales des larves et des adultes de cette espèce (Bates, 1940 ; Roubaud, 1935).

Au Maroc, *An. Sicaulti*, a été d'abord décrit comme une variété d'*An. maculipennis*. Roubaud (1935) a insisté sur le fait que les espèces présentes au Maroc étaient distinctes de l'*An. labranchiae* trouvé en Algérie, en Espagne et en Italie. Bates *et al.*, (1940) a synonymisé *An. sicaulti* avec *An. labranchiae* sans une explication adéquate. Dix ans plus tard, Romeo-viamonte (1950) ont considéré dans leurs études sur les anophèles du Maroc, que *An. Sicaulti* est à la fois une variété et une sous-espèce d'*An. labranchiae* (Romeo Viamonte, 1950 ; Senevet et Andarelli, 1956). Toutefois, Guy et Holstein (1968) ont rapporté dans une étude plus approfondie sur le statut de la forme marocaine de *labranchiae* que *An. sicaulti* n'était pas considéré comme une espèce distincte ou une sous-espèce d'*An. labranchiae*, mais plutôt un synonyme de celle-ci. Par ailleurs, des études non publiées de Bailly-Choumara et Ramsdale (1973) (rapporté par White, 1978) ont soutenu les observations originales de Roubaud (1935) concernant la forme pâle des œufs de *Sicaulti* au Maroc séparé de la forme sombre des œufs de *labranchiae* en Algérie. Cette évidente différence a été confirmée par l'infertilité F1 entre *An. atroparvus* de l'Italie et *An. labranchiae* du Maroc et de l'Italie (White, 1978). Ceci a poussé White (1978) pour ressusciter.

*An. sicaulti* de la synonymie avec *l'An. labranchiae*, et indique un néotype. Cependant, des études ultérieures électrophorétiques ont suggérées qu'*An. sicaulti* représentait simplement des différenciation au niveau des populations d'*An. labranchiae* (Bullini *et al.*, 1980). Trois ans plus tard, De Zulueta *et al.* (1983) ont publiés une étude approfondie sur la population de *l'An. labranchiae* du Maroc et ils ont montré que la morphologie des oeufs varie de la forme typiques d'*An sicaulti* à la forme typique d'*An labranchiae*, mais que la plupart des œufs étudiés (60,5%) étaient intermédiaires. Des formes typiques des chromosomes se sont avérés être homosequential. Cependant ce résultat reste sans aucune preuve ce qui a motivé les auteurs à nouveau de proposer la synonymie d'*An. sicaulti* avec *An. labranchiae*.

Au Maroc, des études associées d'allozyme ont indiqué que la divergence génétique était basse entre *An. labranchiae* et la population prétendue d'*An sicaulti* ( $D=0.014$ ), par conséquent *An. sicaulti* représentait une variété géographique d'*An. labranchiae* (De Zulueta *et al.*, 1983).

L'utilité d'un fragment d'ADN standardisé court du gène de cytochrome oxydase mitochondriale pour l'identification précise d'espèces, a été pour la première fois préconisé par Hebert *et al.* (2003), et depuis, il a été prouvé utile pour la délimitation d'espèces dans un certain nombre de taxons d'insecte (Hogg et Herbert, 2004; Ballet Armstrong, 2006 ; Hajibabaei *et al.*, 2006), incluant les moustiques (Cywinska *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2007 ; Azari-Hamidian *et al.*, 2010 ; Ruiz *et al.*, 2010 et Gonzalez *et al.*, 2010). A ce jour, Aucune étude n'a été réalisée sur le séquençage de l'ADN mitochondriale d'*An labranchiae* du Maroc et aussi de l'Algérie.

Notre objectif est de contribuer à la résolution des problèmes d'identification du complexe maculipennis. Dans cette optique, nous avons mené deux axes d'études, l'application de la PCR multiplex pour l'identification du complexe *Anopheles maculipennis* au nord du Maroc et l'étude de l'ADN mitochondriale d'*An labranchiae* au nord du Maroc et de l'Algérie.

- Le premier axe d'étude s'intéresse à déterminer la composition du complexe maculipennis à travers l'étude de populations d'anophèles capturées dans le nord marocain.
- Et le second axe a pour but d'évaluer si les populations d'*An. labranchiae* du nord du Maroc et de l'Algérie existent comme une seule espèce ou si elles sont génétiquement différentes.

## II- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS PAR LA PCR MULTIPLEX

Au total, 407 *Anopheles maculipennis sl*, récoltés entre 2007 et 2009 dans 8 provinces appartenant au nord-ouest du Maroc, ont été identifiés par la PCR multiplex. Les résultats de cette analyse ont révélé la présence d'une seule espèce qui est *An. labranchiae* (tableau 12).

**Tableau 12:** Collection des anophèles dans les 8 provinces au nord du Maroc

Provinces	Secteurs	Localités	Année de collecte	Nature de l'échantillon	Nombre de spécimens collectés	Identification des espèces	
El Houceima	<i>Ikaouen</i>	<i>Azib jro</i>	2009	Larve	25	<i>An. labranchiae</i>	
		<i>Azib bouflou</i>	2009	Larve	17	<i>An. labranchiae</i>	
Tanger	<i>Gzeinaya</i>	<i>Gzeinaya</i>	2009	Larve	28	<i>An labranchiae</i>	
		<i>Chrada</i>	2009	Larve	10	<i>An labranchiae</i>	
		<i>Sefah</i>		Larve	15	<i>An labranchiae</i>	
Tétouan	<i>Oued law</i>	<i>Chroda</i>	2009	Larve	13	<i>An labranchiae</i>	
		<i>Tizgharite</i>		Larve	15		
Chefchaouen	<i>Bab berrad</i>	<i>Imizegane</i>	2007	Adulte	8	<i>An labranchiae</i>	
Larache	<i>Kasba</i>	<i>Beggara</i>	2007	Adulte	25	<i>An labranchiae</i>	
		<i>Laouamra</i>	<i>Boucharen</i>	2007	Adulte	30	<i>An labranchiae</i>
					2007	Adulte	100
			2009	Larve	80	<i>An labranchiae</i>	
Taza	<i>Oued Amlil</i>	<i>Oued Amlil</i>	2007	Larve	10	<i>An labranchiae</i>	
Salé	<i>Bouknadel</i>	<i>Shoul</i>	2009	Larve	9	<i>An labranchiae</i>	
Khémisset	<i>Roumani</i>	<i>Ait</i>	2007	Adulte	22	<i>An labranchiae</i>	
		<i>Hamousghir</i>					

### III- SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIALE D'*ANOPHELES LABRANCHIAE*

Les fragments d'ADN mitochondrial (COI) ont été amplifiés à partir de 89 spécimens dont 79 provenant du Maroc et 10 de l'Algérie (tableau 13). L'alignement de 658 pb nucléotides a montré que la composition moyenne des nucléotides était de 39,0% de T, 29,3% de A 16,6% de G, et 15,1% de C (la richesse moyenne en AT = 68,3%).

Au sein de la séquence de 89 anophèles, 52 haplotypes uniques ont été détectés avec une diversité d'haplotypes globale (HD) de 0,9402 (tableau 14). Treize haplotypes du COI sont partagés par plus d'un individu - H1 (n = 21; 19 du Maroc, 2 de l'Algérie), H2 (n = 4; 4 du Maroc), H3 (n = 4; 3 du Maroc, 1 de l'Algérie), H4 (n = 3; 3 du Maroc) et H5-13 (n = 2 chacun); H5-7 ; 1 du Maroc, 1 de l'Algérie; H8-13, 2 du Maroc). Les 39 haplotypes restantes (H14-H52) sont uniques (tableau 13, figure 21).

**Tableau 13 :** Détails de 89 espèces d'*An. labranchiae* séquencées collectées

au Maroc et l'Algérie

Pays	Provinces (Secteurs, Localités)	Nombre d'anophèles (haplotype)	Numéro d'haplotypes (fréquence)
Maroc	Chefchaouen, Bab Berrad, Amzegane	3 (3)	4, 37, 49
	Khémisset, Roumani, Ait Hamousghir	22 (18)	1(5), 2(2), 4, 6, 8, 9, 10, 13, 21, 25, 26, 27, 30, 31, 39, 40, 45
	Larache, Kasba, Beggara	20 (15)	1(4), 3(2), 9, 12, 22, 23, 28, 29, 32, 41, 43, 44, 46, 50, 51
	Larache, Laouamra, Boucharen	34 (23)	1(10), 2(2), 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11(2), 12, 13, 18, 19, 20, 24, 33, 34, 35, 36, 42, 47, 48, 52
Algérie	El Tarf, El Kala, Douar Tonga	10 (9)	1(2), 3, 5, 6, 7, 14, 15, 16, 17

Globalement, la comparaison de séquences (n = 89) par paires a révélé 49 mutations dans 46 bases (6,99%), avec une moyenne de différence nucléotides de 3.324 et une diversité des nucléotides entre les individus est de 0,51%. Seize bases sont composées par une seule mutation (Singleton), avec 30 étant la parcimonie informative. Parmi elles, trois bases ont présenté trois variantes alors que les 27 restants ont seulement deux variantes (figure 21).



La recherche FASTA a révélé que l'haplotype du gène COI le plus proche d'*An. labranchiae* est *An. earlei* (un membre néarctique du groupe maculipennis; Numéro d'accèsion au GenBank est AF425843) à 94,7% d'homologie, le système IDS BOLD a révélé une forte similarité d'*An. labranchiae* (97,71%) à *An. atroparvus* en se basant sur les données de séquence générées par le système MBI.

Pour tester si les populations d'*An. labranchiae* du Maroc et de l'Algérie sont génétiquement distinctes, on a procédé à un groupement des spécimens par pays. Dans les échantillons algériens, 13 sites polymorphes ont été détectés, soit neuf haplotypes dans 10 individus, alors que 46 sites polymorphes ont été détectés dans l'échantillon plus large du Maroc, avec 48 haplotypes détectés dans 79 espèces (tableau 14). Malgré la différence dans le nombre des échantillons testés, les valeurs de la diversité des haplotypes (HD) (Maroc: 0,93866; Algérie: 0,97778) et le nombre moyen de différences nucléotidiques (Maroc: 3,32684; Algérie: 3,35556) étaient remarquablement similaires.

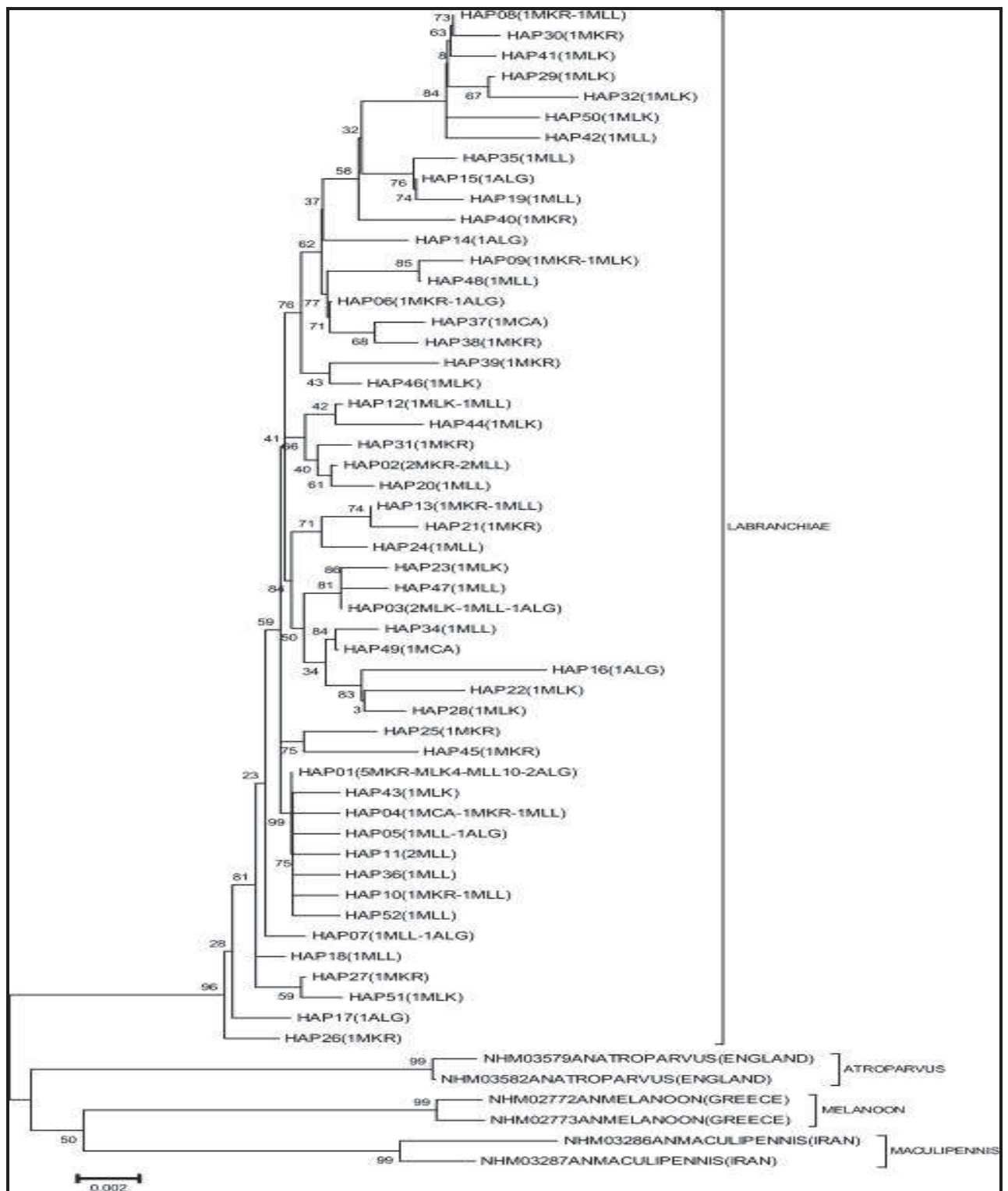
**Tableau 14:** Tableau comparatif de la séquence du gène Cytochrome Oxydase sous unité I (COI) de la population d'*An. labranchiae* du nord du Maroc et de l'Algérie.

Résumé statistique	Toutes les données	Maroc	Algérie
Nombre de séquences	89	79	10
Nombre de sites polymorphiques	46	46	13
Nombre total de mutations	49	49	14
Nombre d'haplotype	52 uniques haplotypes	48	9
La diversité d'haplotype	0.94025	0.93866	0.97778
Moyenne de la différence nucléotide	3.324	3.32684	3.35556
La diversité des nucléotides	0.00510	0.00506	0.00510

En effet, la distance moyenne (K2P) par pairwise entre les populations du Maroc et celles de l'Algérie était de 0,0051 ce qui est similaire à la distance moyenne globale de l'ensemble des données, l'absence de différenciation entre les deux populations des deux pays. Mais ces résultats restent statistiquement non significatifs ( $p=0,5817$ ). Cela est en outre soutenu par les cinq haplotypes du gène cytochrome oxydase I (COI) mitochondrial qui sont partagés entre les populations marocaines et algériennes (H1, H3, H5, H6 et H7) (tableau 14).

L'arbre Neighbour-joining (NJ) (figure 22) indique clairement la présence d'une seule espèce, *An. labranchiae*, au Maroc et en Algérie. *An. labranchiae* a été le plus étroitement lié à *An. atroparvus*, suivie par *An. melanoon* et *An. maculipennis*. En se basant sur leurs distances génétiques et qui sont de 2,66%, 2,76% et 2,86% respectivement. *An. atroparvus* et *An. maculipennis* étaient les plus génétiquement diversifiées, avec une distance moyenne génétique de 3,12%. La variation moyenne intraspécifique pour *An. labranchiae* est 0.015%.

Les données de séquences d'ADNmt d'*An. labranchiae* sont disponibles dans le GenBank sous les numéros d'accès suivants: (Algérie: HQ860403-HQ860412; Maroc: HQ860331-HQ860402).



**Figure 22:** l'arbre *Neighbour-Joining* a été créé en utilisant la matrice de distance (K2P) de 89, *An. labranchiae* (d'Algérie (n = 10) et le Maroc (n = 79)), et les taxons outgroup au sein du groupe maculipennis: *An. atroparvus* (n = 2), de l'Angleterre, *An. maculipennis* (n = 2) de l'Iran et *An. melanoon* (n = 2) de la Grèce). Les localités pour *An. labranchiae* sont: MCA: Maroc, Province de Chefchaouen, Bab Berrad, Amzegane; MKR: Maroc, Province de Khémisset, Roumani, Ait Hamousghir; MLK : Maroc, Province de Larache, Kasba, Beggara; MLL : Maroc, Province de Larache, Laouamra, Boucharen. ALG: Algeria, Province d'El Tarf Douar Tonga.

## IV- DISCUSSION

### IV- 1 PCR multiplex

Plus de la moitié des vecteurs du paludisme dans le monde comportent des espèces isomorphes des complexes (Harbach, 2004; Foley *et al.*, 2007). L'identification correcte des *taxa* composants est essentielle pour le contrôle efficace des vecteurs, car certaines espèces du complexe sont considérées comme des vecteurs compétents.

Le choix de la PCR multiplex comme méthode de diagnostic moléculaire servant à l'identification du complexe *d'Anopheles maculipennis* est dicté par sa rapidité, sa simplicité, sa reproductibilité. Elle a été considérée comme outils fort pour l'identification des insectes. En effet, l'application de la PCR multiplex pour 407 espèces, récoltées au nord ouest du Maroc, a mis en évidence la présence d'une seule espèce *An. labranchiae* dans les différentes régions étudiées à différentes périodes ; nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Faraj *et al.*, en 2004 dans une étude préliminaire sur le complexe Maculipennis au Maroc (Faraj *et al.*, 2004). En se basant sur ces résultats, il est apparu clairement qu'*An. labranchiae* est le seul représentant du complexe Maculipennis au nord du Maroc.

### IV-2 Séquençage de l'ADN mitochondrial

Malgré l'importance d'*An labranchiae* dans la transmission du paludisme, peu d'études ont été réalisées sur l'analyse de son ADN à travers son aire géographique. Bien que 21 séquences d'ADN soient disponibles pour *An. labranchiae* dans le GenBank, elles sont toutes représentantes de la région d'ADN ribosomiale nucléaire (ITS2). Les résultats obtenus dans notre étude sont considérés comme les premières séquences d'ADN mitochondriale pour *An labranchiae* du Maroc et de l'Algérie (Laboudi *et al.*, 2011).

L'étude génétique de 89 échantillons *d'An labranchiae*, originaires du nord du Maroc et de l'Algérie, au moyen de marqueurs mitochondriaux (COI) a permis l'identification d'haplotypes identiques au sein des deux pays. La diversité génétique à l'intérieur des spécimens provenant de l'Algérie et du Maroc se sont avérés identiques (0.51%). Cette variabilité génétique correspond clairement à la variation intra spécifique (Cywinska *et al.*, 2006; Azari-Hamidian *et al.*, 2009 ; Ruiz *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2010). Les résultats de notre travail rejettent l'hypothèse qui dit que les populations *d'An. labranchiae* sont génétiquement distinctes à travers les montagnes de l'Atlas (Roubaud, 1935 ; Bailly-Choumara et Ramsdale 1973, rapporté par White, 1978 ; Laboudi *et al.*, 2011), et soutiennent la synonymie d'*An sicaulti* avec *An. labranchiae* comme elle a été proposée par De Zulueta *et al* (1983).

Actuellement, le système MBI abrite des données de séquence d'ADN pour 463 espèces d'anophèles officiellement reconnues dans le monde (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>). La séquence de l'ADN mitochondriale du gène Cytochrome Oxydase I rapportée dans notre travail présente une similarité de 97,71% avec celle d'*An. atroparvus*, rapporté antérieurement comme espèce sœur d'*An. labranchiae* en se basant sur le séquençage de l'ADN ribosomale du gène ITS2 (Marinucci *et al.*, 1999).

L'étude de la morphologie des œufs a été largement considérée comme une méthode de référence utilisée par les systématiciens pour l'identification des espèces européennes composantes du complexe *Maculipennis* (Hackett et Missiroli, 1935; Guy *et al.*, 1976; Romi *et al.*, 2000). En effet, les œufs d'*An. labranchiae* montraient des variations de couleur, de motif et du modèle chorionique avec des niveaux élevés (Roubaud, 1935; Bailly-Choumara et Ramsdale, 1973 non publiés, rapporté par White, 1978). *An. melanoon* et *An. subalpinus* ont été considérés depuis longtemps comme des espèces séparées. Cette hypothèse est basée sur la morphologie différente de leurs œufs. Les œufs d'*An. subalpinus* possèdent une couleur gris tachetés tandis que ceux d'*An. melanoon* sont complètement noirs. Toutefois, l'analyse de la séquence d'ADN a prouvé que les deux espèces étaient effectivement des espèces conspécifiques, d'où *An. subalpinus* a été réduite à un synonyme d'*An. melanoon* (Linton *et al.*, 2002 et Boccolini *et al.*, 2003). L'analyse de séquence d'ADN a également montré que les trois types d'œufs morphologiquement distincts d'*An. stephensi* Liston sont également des variantes différentes d'une seule espèce (Oshaghi *et al.*, 2006 et Azari-hamidiens *et al.*, 2010).

Au Maroc, *An. labranchiae* est une espèce très ubiquiste qu'on retrouve sur les plaines maritimes méditerranéennes et atlantiques, jusqu'au sud d'Agadir. Son aire de distribution continentale recouvre pratiquement tout le territoire, englobant les chaînes de montagne du Rif et du Moyen-Atlas (Anfreville, 1916; Delanoë, 1917; Charrier, 1924; Seguy, 1930; Sicault *et al.*, 1935; Langeron, 1938; Callot, 1940; Ristocelli, 1946; Bonjean, 1947; Gaud, 1953; Guy, 1963; Trari, 1991; Himmi, 1987; 1991; Faraj *et al.*, 2010). Cette espèce est très dominante dans le nord-ouest du Maroc avec des densités élevées, associées à des zones de culture de riz (Gaud *et al.*, 1949), avec des pics durant le mois d'été qui correspond à la période d'irrigation des rizières (Faraj *et al.*, 2008a).

En Algérie, *An. labranchiae* est la seule espèce connue du complexe *Maculipennis* (Sergent, 1937, 1939; Senevet et Andarelli, 1961). Il est largement réparti dans la région nord de l'Algérie aussi bien dans le littoral et les plaines que dans les régions de montagne. *An. labranchiae* a été également trouvé dans le désert du Sahara, dans le petit village de Silet (Seguy, cité par Senevet et Andarelli; 1956).

Des études antérieures réalisées sur les populations marocaines d'*An. labranchiae* (Faraj *et al.*, 2008b) ont montré la susceptibilité de cet insecte au propoxur, au fénitrothion, à la perméthrine et sa résistance à divers degrés au DDT. Les essais moléculaires ont indiqué l'absence de mutation de gène kdr et la résistance semble être due à des mécanismes de détoxification spécifiques au DDT (Faraj *et al.*, 2008b).

En conclusion, l'application de l'outil PCR multiplexe à l'identification du groupe *Anopheles maculipennis* nous a permis de conclure que la seule espèce reconnue de ce complexe est *An. labranchiae*. D'un autre côté, l'étude de l'ADN mitochondriale d'*An labranchiae* est importante puisqu'elle apporte des éléments nouveaux sur cette espèce, non seulement au Maroc mais aussi en Algérie où il n'y avait jamais eu d'études de séquençage de l'ADN mitochondriale.

### CHAPITRE III :

#### APPROCHE ECOLOGIQUE D'ANOPHELES LABRANCHIAE AU NORD DU MAROC : REGION DE LARACHE

---

#### I-PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Au Maroc, jusqu'à la fin de la première moitié du XX siècle, le paludisme représentait encore à côté des autres maladies pestilentielles; typhus, peste, variole et fièvre récurrente ; une des grandes endémo-épidémies qui ravageaient le pays depuis des siècles. Il se présentait comme une maladie endémique avec des poussées épidémiques estivo-automonales fréquentes. Ces dernières étaient fonction de l'importance du réservoir de parasite et de la densité anophélienne. Depuis le début des années vingt, les autorités sanitaires du pays avait fait de la lutte antipaludique une priorité et c'est en 1965 qu'un programme de lutte contre cette maladie a été lancé. A partir de 1999, le Maroc a adopté une nouvelle stratégie de lutte basée sur un ensemble d'interventions et des campagnes de lutte par utilisation du DDT, le dépistage actif et le traitement des cas. Cependant, on a assisté à une recrudescence du nombre de cas de paludisme autochtones à *P. vivax* depuis l'année 2002 pour arriver à zéro cas en 2004 (OMS, 2007).

*Anopheles (Anopheles) labranchiae* Falleroni, 1926 a toujours été considéré comme le vecteur principal du paludisme au Maroc. Cette espèce qui colonise une très grande partie du pays trouvait sa zone de prédilection dans les plaines atlantiques au nord-ouest comme la région de Larache où elle constituait plus de 95 % du peuplement anophélien (Gaud *et al.*, 1950).

Dans la province de Larache, où notre étude a eu lieu, le paludisme à *P. vivax* était endémique et transmis par *An. labranchiae*. Les derniers cas du paludisme autochtones ont été signalés en 1997. Au-delà de cette année, aucun cas autochtone n'a été enregistré (Ministère de la santé, 2007). Toutefois, des activités agricoles récentes dans la région de Larache telles que l'irrigation et la culture du riz ont augmenté la densité des moustiques. Récemment, Faraj *et al.*, 2008 ont rapporté une forte abondance des larves d'*An. labranchiae* dans cette région, avec un pic durant les mois d'été qui correspondent à la période d'irrigation des rizières. Par conséquent, cette région demeure un site potentiel à risque de transmission du paludisme. Ces observations suggèrent que les responsables du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) doivent être plus vigilants et constamment prêt à évaluer la répartition spatiale et temporelle des larves de moustiques.

Par ailleurs, des études antérieures sur les gîtes de développement larvaire au Maroc ont donné des informations importantes sur la biologie et l'écologie des espèces larvaires de moustiques. En 1991, Trari a rapporté le rôle de la salinité et le pH de l'eau sur l'apparition et la distribution des larves de moustiques. En 1995, Louah a montré que le principal facteur de l'apparition des larves de moustiques est la salinité de l'eau ainsi que les facteurs humains tels que l'utilisation des terres Himmi (2007) a mené des études temporelles sur les caractéristiques des habitats aquatiques des Culicidés incluant les anophèles. Elle a rapporté que les plus importants facteurs influençant la propagation des larves étaient la profondeur et la température du gîte larvaire. Malgré ces constatations, la relation entre les paramètres environnementaux et l'abondance des larves de moustiques nécessite encore d'autres études pour mieux comprendre la dynamique des gîtes larvaires du vecteur principal du paludisme au Maroc, *An. labranchiae*.

Cette étude a pour objectif de déterminer la caractérisation spatiale des habitats larvaires, ainsi que la corrélation entre les facteurs environnementaux et la densité d'*An. labranchiae* répartie dans différents gîtes de la région de Larache.

## II- PROPORTION DES LARVES D'ANOPHELES COLLECTEES

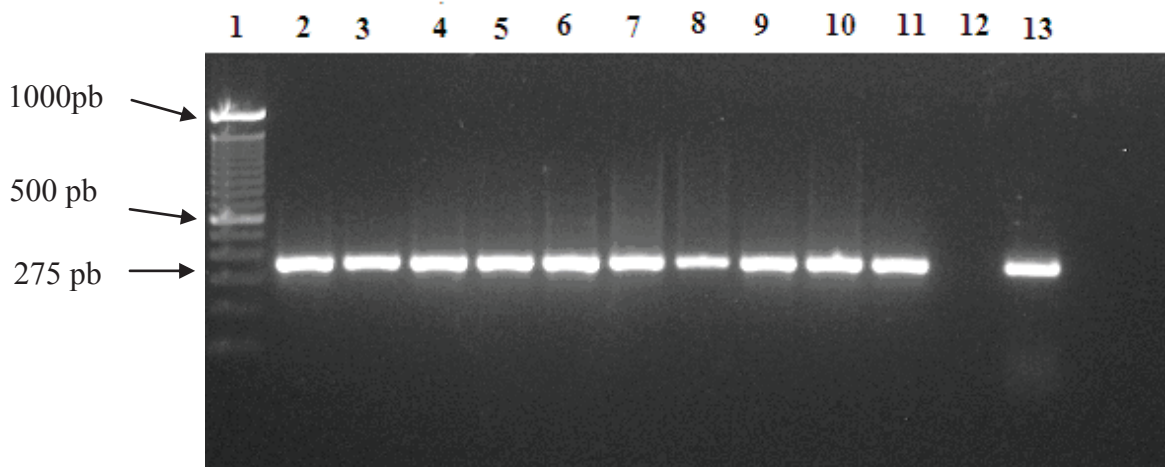
Parmi 54 sites échantillonnés, 52% étaient productifs de larves d'anophèles. Au total, 1145 larves d'anophèles ont été collectées, 829 appartiennent aux 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stades larvaires et 316 appartiennent aux 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> stades larvaires. Le coefficient de corrélation entre les premiers et les derniers stades larvaires était d'environ 1 ( $r^2 \approx 1$ ,  $p < 0,05$ ). L'identification morphologique des larves d'anophèles du troisième et quatrième stade larvaire, par l'utilisation de la microscopie a révélé, que 76% (n = 629) appartenant au groupe *An. maculipennis* et les 24% restants (n = 200) ont été identifiés comme *An. cinereus* (tableau 15).

**Tableau 15 :** Le nombre total des larves d'anophèles du troisième et quatrième stade collectés dans 10 secteurs de la province de Larache

	Secteurs										Total	%
	Laoum ra	zouada	Rissana Janoubia	Rissana Chamalia	Ayacha	Beni aarouss	Zaaroura	Sahel	souk lqoula	Souk tolba		
Nombre de gîte prospecté	23	11	6	2	2	2	1	1	4	2	54	
Nombre d' <i>An. labranchiae</i>	357	105	82	10	13	22	11	0	19	10	629	76
Nombre d' <i>An. Cinereus</i>	0	0	33	15	12	66	24	0	26	24	200	24
<b>Total</b>	<b>357</b>	<b>105</b>	<b>115</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>88</b>	<b>35</b>	<b>0</b>	<b>45</b>	<b>34</b>	<b>829</b>	

### III- IDENTIFICATION MOLECULAIRE DU COMPLEXE ANOPHELES MACULIPENNIS

L'identification du complexe *Anopheles maculipennis* par la PCR multiplex a montré la présence uniquement de l'espèce *An. labranchiae* (figure 23). Cette dernière a été trouvée dans tout type d'habitat prospecté. Cette espèce était la plus prédominante dans les secteurs de Laouamra et de Zouada proche de la ville de Larache et rare dans le nord restant des zones d'étude (tableau 15). Bien que la productivité d'*An cinereus* se trouve abondante dans les secteurs de Beniारouse et de Rissana janoubia, cet anophèle n'est présent que dans les rivières.



**Figure 23 :** Exemple du résultat de la PCR multiplex : 1 Marquer de taille, 2-11: échantillons, 12: contrôle négatif, 13 : contrôle positif

### IV- ANALYSE MULTIVARIÉES

#### IV-1 Corrélation entre les paramètres physico-chimiques

Le traitement de la matrice par Analyse factorielle des correspondances multiple (l'AFCM) (Annexe 2) fait apparaître des valeurs propres et des pourcentages d'inertie pour les premiers axes.

Les deux premiers axes descripteurs sont conservés et totalisent 45,36 % de l'information recueillie avec respectivement de 29,56 %, 15,80 % pour les axes de F1 et F2 (figure 24). Les valeurs propres de ces deux axes (F1 et F2) sont élevées, en particulier celui du premier axe (29,56 %) ; ceci implique une bonne diagonalisation des données sur chaque axe et indique un assez recouvrement entre les stations et les espèces récoltées. Cette information est suffisante pour ressortir les caractéristiques qui organisent la répartition des espèces dans ces stations.

L'examen de la matrice de corrélation entre les variables révèle la présence d'un premier ensemble de variables, constitué de descripteurs bien corrélés entre eux. Il s'agit de la turbidité (Tr)/type de gîte (Tg) et le pH/Tr qui montrent une corrélation très significative (Tableau 16). Les autres éléments à savoir la profondeur (pr)/ la turbidité (Tr) a une corrélation moyennement significative. Par contre, le reste des paramètres ont des corrélations faiblement significatives.

**Tableau 16 :** Matrice de corrélation entre les variables étudiées

VARIABLES	Tg	Pr	pH	Tr	Cd	Od	Sa	Te	Paf	Pem	Dh	Dal
<b>Tg</b>	<b>1,00</b>											
<b>Pr</b>	0,46	<b>1,00</b>										
<b>pH</b>	0,14	0,52	<b>1,00</b>									
<b>Tr</b>	0,52	0,41	0,69	<b>1,00</b>								
<b>Cd(µs/cm)</b>	0,15	0,42	0,14	0,21	<b>1,00</b>							
<b>Od(mg/l)</b>	0,04	-0,03	-0,01	0,15	0,46	<b>1,00</b>						
<b>Sa</b>	0,37	0,26	0,08	0,13	0,47	0,35	<b>1,00</b>					
<b>T</b>	0,07	0,26	0,08	0,07	0,06	-0,24	0,23	<b>1,00</b>				
<b>Paf</b>	0,50	-0,03	-0,48	-0,01	-0,01	0,07	0,05	-0,09	<b>1,00</b>			
<b>Pem</b>	-0,35	-0,52	-0,45	-0,35	-0,29	-0,13	-0,31	-0,08	0,22	<b>1,00</b>		
<b>Dh</b>	0,08	0,20	0,17	0,40	0,06	-0,03	-0,22	0,15	0,02	0,12	<b>1,00</b>	
<b>Dal</b>	-0,64	-0,62	-0,63	-0,70	-0,16	0,01	-0,26	-0,20	-0,02	0,39	-0,20	<b>1,00</b>

Par ailleurs, le tableau ci-dessus montre une association négative entre le type du gîte (Tg), le pH, la profondeur et la turbidité de l'eau et la densité d'*An. laranchiae*. D'autre part, la présence des plantes émergentes (Pem) est légèrement positivement associée à la densité d'*An. labranchiae*

## IV-2 Corrélation entre les paramètres physico-chimiques et environnementaux avec la densité de larves d'anophèles

### a- L'axe factoriel F1

En coordonnées positives plusieurs classes des différentes variables étudiées particulièrement la classe 0 de la profondeur (Pr0), la classe 0 de la turbidité (Tr0), la présence des plantes émergentes (Pem1) et le Ph0. Ces variables sont fortement corrélées avec la densité élevée d'*An. labranchiae* (figure 24).

En coordonnées négatives plusieurs classes de variables contribuent à la constitution de cet axe F1, les classes de profondeur (Pr1) et l'absence des plantes émergentes (Pem0). Ces variables sont associées avec la faible densité d'*An. labranchiae*.

Ce premier axe F1 montre un gradient croissant de la profondeur, du pH et de la turbidité du côté positif vers le côté négatif de l'axe.

### b- L'axe factoriel secondaire F2

En coordonnées positives plusieurs classes de variables particulièrement la classe 1 de salinité (Sa1) et la présence des algues filamenteuses (Af1). Ces deux variables sont en corrélation étroite avec la forte densité d'*An. cinereus*,

En coordonnées négatives plusieurs classes de variables contribuent à la construction de cet axe F2, à savoir les classes 0 de la salinité (Sa0) et la classe 2 de la turbidité (Tr2)

Nous pouvons dire que ce deuxième axe montre deux gradients à savoir :

- Un gradient croissant de salinité croissant du côté négatif vers le côté positive
- Deux autres gradients, la turbidité qui est croissante du côté positif vers le côté négatif de cet axe.

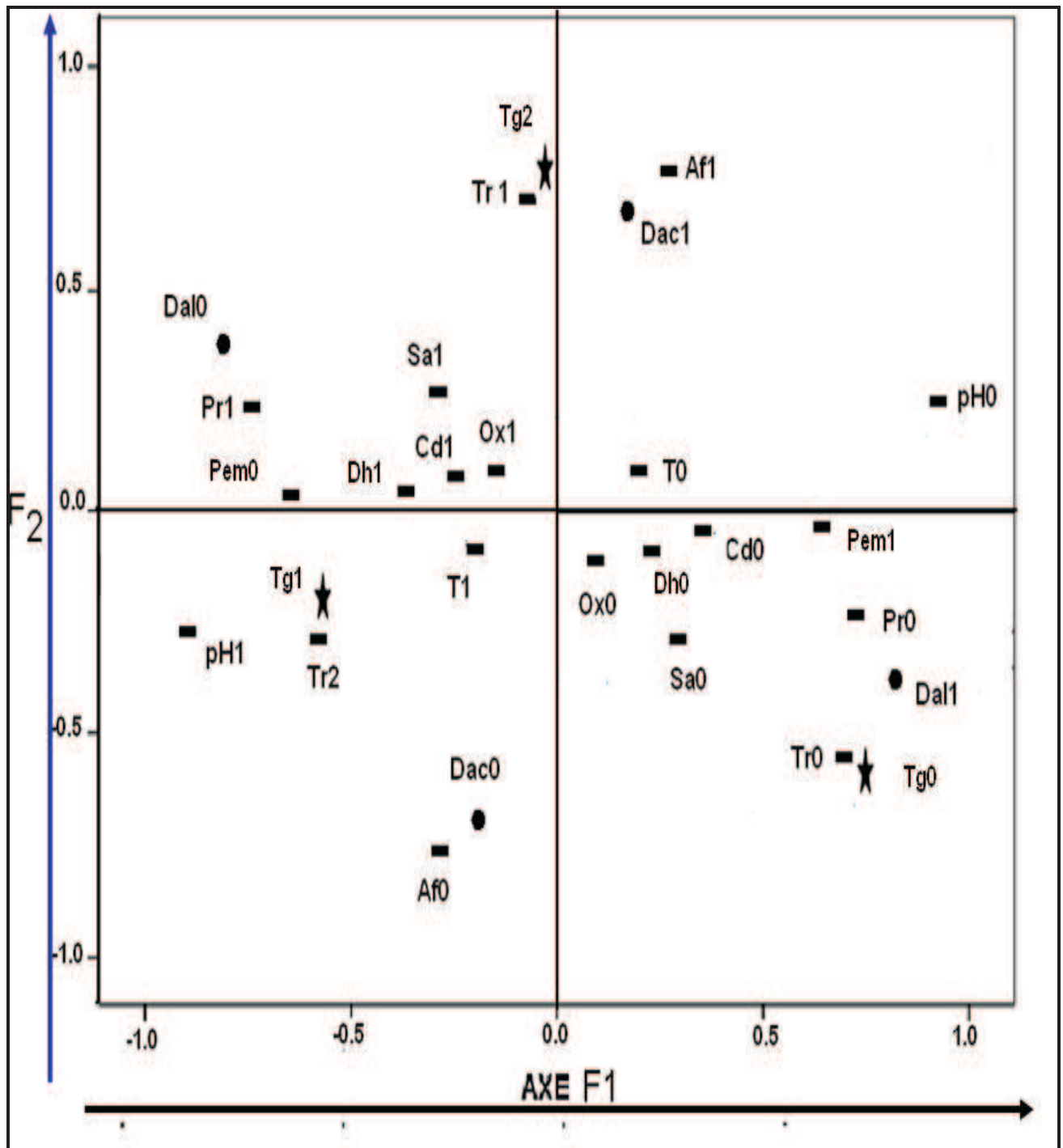


Figure 24: Approche graphique de l'AFCM des paramètres physicochimiques et la densité des larves selon le plan F1 et F2

● Densité des larves d'anophèles    ■ les paramètres physicochimiques et environnementaux.

### IV-3 Distribution spatiale des larves d'anophèles

L'AFCM réalisée entre la densité des larves d'anophèles et le type de gîte a montré qu'*An. labranchiae* est fortement associée avec les rizières et que *An. cinereus* est associé à des cours d'eau (rivières), tandis que les marécages ont montré la présence des deux espèces avec des densités faibles (Figure 25).

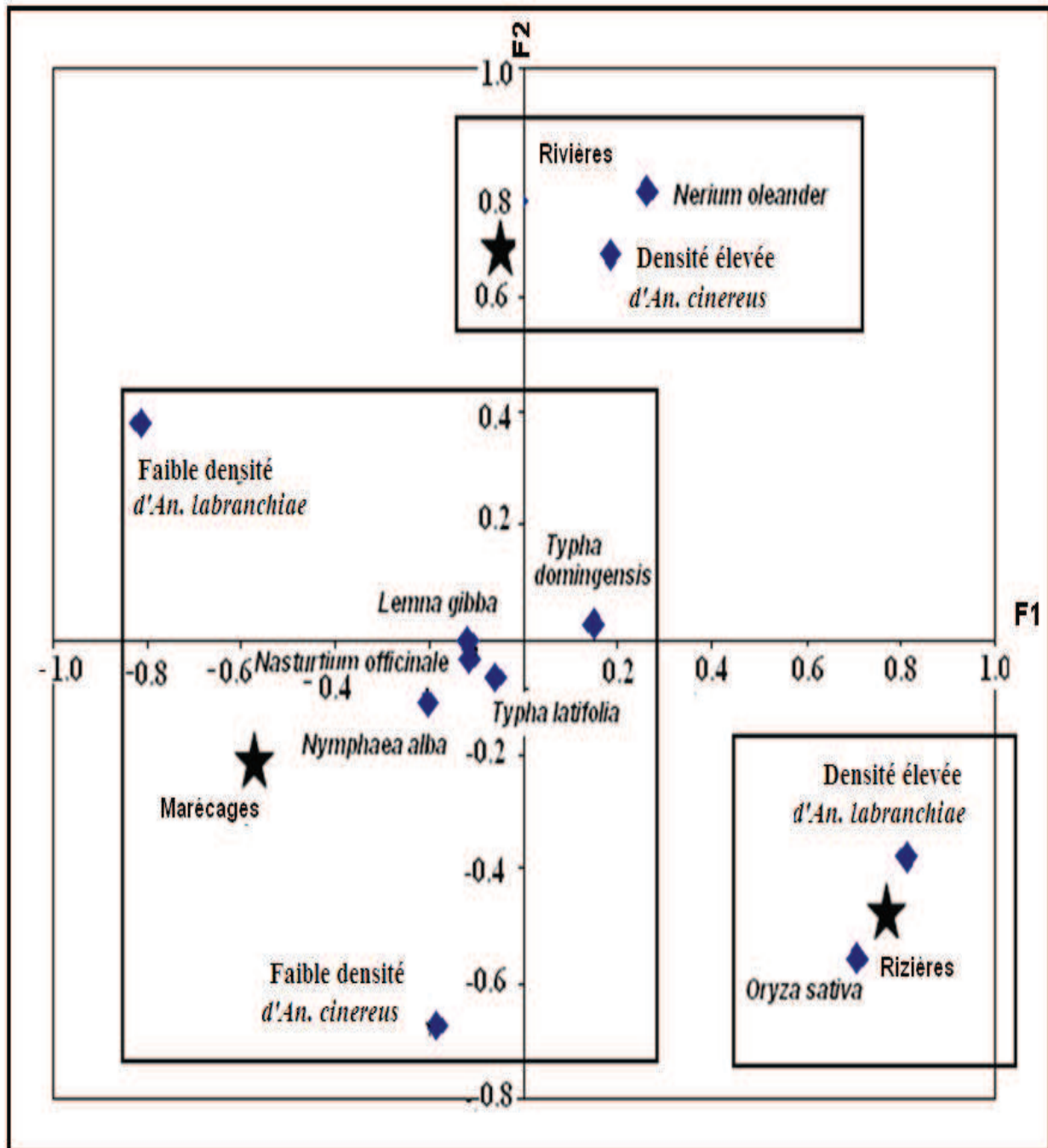


Figure 25 : Distribution des habitats aquatiques avec la densité des espèces récoltées sur le plan

F1x F2

## V- DISCUSSION

### V-1 Les anophèles récoltés

La caractérisation de l'habitat aquatique des larves d'anophèles et sa corrélation avec les facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement est essentielle pour la lutte antivectorielle contre le paludisme.

Notre enquête a été réalisée afin de déterminer la relation entre les différents paramètres d'environnement et la densité des larves d'anophèles en particulier *An. labranchiae*. Elle a montré que parmi les 54 gîtes larvaires échantillonnés, seulement 52% ont été confirmés positifs pour les larves d'anophèles. Ce taux faible de positivité des gîtes larvaires pourrait être due à une combinaison de différents facteurs dont on peut citer le contrôle biologique, en l'occurrence la présence des poissons *Gambusia sp* qui se nourrissent des larves aquatiques (Rishikesh *et al.*, 1988), l'activité humaine, ainsi que la pollution due à des rejets de divers déchets industriels qui peuvent conduire à modifier la structure qualitative des habitats aquatiques, ce qui réduit la population des larves (Ramdani, 1986).

Parmi les 829 larves d'anophèles appartenants aux 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stades larvaires, 76% sont *An. labranchiae* et 24% sont *An. cinereus*. *An. labranchiae* a été l'espèce la plus répandue dans la zone d'étude, elle est la seule représentante du complexe maculipennis (Faraj *et al.*, 2004 ; Laboudi *et al.*, 20011) et le principal vecteur du paludisme au Maroc. Cette espèce est présente en forte densité dans le nord ouest du Maroc (Benmanssour *et al.*, 1972 ; Faraj *et al.*, 2008a). Elle est connue par sa grande capacité vectorielle et sa préférence trophique pour une grande partie du bétail dans la province de Larache (Faraj *et al.*, 2008a). D'autre part, *An. cinereus* est considéré comme un moustique omniprésent connu dans l'ensemble de l'Afrique du Nord et dans les régions montagneuses du Maroc (Trari *et al.*, 2004 ; Laboudi *et al.*, 2012). Bien que cette espèce a été trouvée porteuse de sporozoïtes de *Plasmodium* durant l'épidémie qui s'est produite à Midelt, au Maroc en 1972, son rôle reste limité dans la transmission du paludisme (Ed et Sergent, 1928 ; Benmanssour, 1972). La coexistence d'*An. labranchiae* et *An. cinereus* dans le même habitat aquatique était attendu dans la zone d'étude (Gaud *et al.*, 1952). La coexistence de plus d'une espèce dans un habitat aquatique à un moment donné indique que ces espèces de moustique présentent la même nature et les mêmes préférences d'interagir les unes avec les autres (Pemola *et al.*, 2007). Ceux ci prouvent que les deux espèces ont probablement les mêmes comportements dans les mêmes habitats aquatiques.

Parmi les 1145 larves d'anophèles collectées, 829 (72 %) appartiennent au 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stade larvaire et 316 (28 %) des anophèles appartenant aux 1<sup>ers</sup> et 2<sup>èmes</sup> stades larvaires.

La disproportion (28 %) et (72 %) observée entre les premiers et les derniers stades larvaires pourrait s'expliquer par le fait que les larves des premiers stades sont plus facilement dispersées par le mouvement de l'eau (Ulrike Fillinger *et al.*, 2009). Par ailleurs, la survie des larves dépend de différents facteurs comme la taille de l'habitat, la stabilité et la conductivité de l'eau (Bentley *et al.*, 1989). Ces facteurs sont importants pour les femelles des larves adultes qui cherchent des sites de ponte et par conséquent, ils peuvent avoir un impact sur la survie des larves jeunes. De plus, la compétition entre les espèces sympatriques établis pour la nourriture peut expliquer le taux faible des premiers stades larvaires. Roubaut et Treillard (1934) ont montré que le taux des derniers stades larvaires obtenu *d'An. maculipennis sl* a été plus important quand ils ont reçu une nourriture riche. Seules les larves du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stade étaient plus compétitives et utilisent plus de nourriture que les premiers stades larvaires. Metge et El Alaoui ont montrés (1987) que les comportements de cannibalisme ont été exprimés par les larves des derniers stades plutôt que ceux des premiers stades larvaires, lorsque la température de l'eau dépasse 12 °C. Cela a été expliqué par le phénomène interspécifique et intraspécifique qui est un processus d'autorégulation de la population des larves dans les sites de reproduction (Metge et El Alaoui, 1987).

#### **V-2 corrélations entre les paramètres physicochimiques et la densité d'anophèles**

De nombreuses études sur la distribution spatiale des larves de moustiques au Maroc ont été étudiées et analysées statistiquement par l'AFCM (Dakki, 1985 ; Qninba *et al.*, 1985 ; Benhoussa *et al.*, 1993 ; El Alami, 2002 ; Belqat, 2002). Dans la présente étude, l'analyse factorielle des correspondances multiples a montré que la turbidité et la profondeur de l'habitat aquatique ont été les facteurs prédictifs de la densité des larves *d'An. labranchiae*. Il semble que la turbidité diminue la densité des larves d'anophèles. Ce résultat est en accord avec les travaux de Sattler *et al.*, (2005) qui ont constaté que les larves d'anophèles *sp* sont plus susceptibles d'être présentes dans des eaux claires. Des rapports similaires (Robert *et al.*, 1998 ; Minakawa *et al.*, 1999 et Edillo *et al.*, 2002) ont montré que les anophèles immatures préfèrent les eaux limpides et légèrement troubles pour leurs reproductions. L'habitat aquatique de moins de 0,5 m de profondeur est considéré comme le lieu de reproduction idéal pour les larves *d'An. labranchiae*, surtout que les faibles profondeurs facilitent la ponte de cette espèce (Himmi, 2007). Des études antérieures en Tanzanie ont montré que la profondeur inférieure à 0.5m est corrélée positivement avec la richesse des espèces de moustiques (Sattler *et al.*, 2005).

Concernant le pH de l'eau, il était considéré comme un facteur important pour le développement des moustiques par de nombreux auteurs. Notre étude a rapporté que le pH entre 6 et 7 coïncide avec la forte densité *d'An. labranchiae*. En effet, tous les sites de larves *d'An. labranchiae* sont productifs quand les valeurs de pH sont proches de la neutralité. Cependant, la

densité des moustiques est faible dans les eaux polluées à forte turbidité avec des valeurs de pH supérieur à 8. En 1929, Mac Gregor a confirmé le rôle indirect de ce paramètre sur la microfaune et la flore. Cependant, en 1931 Pruthi a montré que les larves ont été capables de vivre dans l'eau où le pH ne serait pas si propice à leur développement, tandis que Rioux (1955) et El Alaoui (1985) n'ont trouvé aucun effet significatif du pH sur la survie des larves d'anophèles.

Par ailleurs, *An. cinereus* était limité dans l'habitat fluvial où la salinité est plus élevée. Cela peut être expliqué par le comportement des femelles gravides d'*An. cinereus* qui préfèrent les rivières comme type de site de reproduction.

Notre étude a révélé que la présence des plantes émergentes est positivement associée avec la forte densité des larves d'*An. labranchiae*. Elles constituent la source principale de nourriture pour les larves de moustique (Gimming *et al.*, 2002). Des études précédentes avaient montré une forte association entre la végétation et la présence des larves d'anophèles (Savage *et al.*, 1990 ; Rajmankova *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1993; Rajnikant *et al.*, 1996 ; Aditya *et al.*, en 2006) ; elles ont également signalé la relation entre la végétation et les stades immatures des larves d'anophèles ainsi que le lien entre l'abondance des larves et la présence d'un type particulier de végétation. Il apparaît clairement dans notre étude qu'*An. labranchiae* préfère les rizières tandis qu'*An. cinerius* préfère les rivières pour leur reproduction.

### V-3 Distribution spatiale

L'AFCM menée entre la densité des larves d'anophèles et le type d'habitat a montré qu'*An. labranchiae* a été associée à des champs de rizières et *An. cinereus* a été associée à des rivières, alors que les marécages sont caractérisés par la présence des deux espèces avec de faibles densités.

Les rizières sont des sites d'eau artificielles et permanentes, exposées directement au soleil. Leur irrigation se fait durant le mois de Mai. La profondeur du site ne dépasse pas généralement 0,5 m. La seule plante émergente dans ce site était *Oryza sativa*. Chimiquement, cet habitat aquatique possède des eaux claires caractérisées par leur faible salinité et leur teneur en oxygène dissous et leur pH neutre. Ce type de gîte est caractérisé par la présence d'une seule espèce qui est *An. labranchiae* avec des densités beaucoup plus élevées que dans les autres types d'habitats. Faraj *et al.*, (2008) ont également rapporté la plus grande réceptivité des rizières par rapport aux marécages.

D'autre part, les rivières connues comme sites de reproduction permanents sont dominées par des plantes émergentes de la famille *Cypéracées* et *Apocynacées*. Ce site a été caractérisé par une salinité élevée par rapport aux autres types d'habitat. Il était dominé par une densité élevée des larves d'*An. cinereus*. Ce site de reproduction de larves a été caractérisé par une turbidité

moyenne et la présence d'algues filamenteuses. Ces dernières avec la présence des plantes émergentes semblent être la principale source alimentaire pour les moustiques d'anophèles.

Finalement, les marécages sont des sites aquatiques permanents ou temporaires dépendant des précipitations saisonnières. Ils sont dominés par des plantes émergentes appartenant à la famille des *Thypaceae*. Deux espèces de larves d'anophèles étaient présentes avec une densité faible: *An. labranchiae* et *An. cinereus*. Ce faible taux de larves d'anophèles est dû aux différents paramètres physiques: une forte turbidité,  $\text{pH} > 8$ , la température entre 30-36 °C et une conductivité élevée.

## VI- CONCLUSION

Le choix de la province de Larache comme région d'étude était basé sur sa situation côtière, les caractéristiques de ses espèces culicidiennes et son passé épidémiologique dans la transmission du paludisme.

Lors de cette étude, la composition du groupe *Anopheles maculipennis* a été étudiée. Il en résulte la présence de la seule espèce *An. labranchiae* connue comme vecteur principal du paludisme au Maroc. De plus, cette étude a permis de conclure que les densités de larves d'anophèles sont beaucoup plus élevées dans les habitats aquatiques caractérisés par une faible profondeur et un taux faible en turbidité avec la présence de plantes émergentes telles que *Oryza sativa*. En outre, le pH neutre de l'eau constitue le lieu idéal de ponte des larves d'anophèles. Par conséquent, les principales cibles potentielles importantes de la lutte antivectorielle contre le paludisme au Maroc sont les larves d'*An. labranchiae*. Grâce à la modification de l'habitat des larves, le contrôle du site de reproduction pourrait continuer à être la clé de lutte antivectorielle. La compréhension de la relation existant entre les habitats aquatiques, les facteurs environnementaux et l'apparition des larves de moustiques est nécessaire pour une application efficace des méthodes de lutte contre les moustiques. D'autres études et enquêtes avec plus de variables et d'autres sites de larves de moustique au nord-ouest du Maroc, sont recommandées.

## *CHAPITRE IV :*

### *ELEVAGE D'ANOPHELES LABRANCHIAE*

---

#### **I-INTRODUCTION**

L'élevage de moustiques en général et des anophèles en particulier se révèle être un instrument d'investigation indispensable en entomologie médicale. Il offre de nombreuses possibilités d'étude dans des domaines aussi divers que: la systématique, la physiologie, l'éthologie, la détermination de la sensibilité aux insecticides, destinés la lutte anti-vectorielle et la transmission expérimentale d'agents pathogènes.

Au Maroc, de part son abondance, sa densité ainsi que sa capacité vectorielle et sa large répartition géographique, *An. labranchiae* constitue le principal vecteur du paludisme, L'étude de son écologie ainsi que sa relation avec la transmission du paludisme ont été largement étudiées sur le terrain ; toutefois, peu de données existent sur sa biologie particulièrement au laboratoire. *An. labranchiae*, espèce eurygame dont la reproduction ne peut être obtenue en captivité que difficilement et après une période de vol libre en chambre spéciale d'où la difficulté de la stabilité des colonies d'*An. labranchiae* aux conditions de laboratoire permettant d'obtenir un nombre suffisant des moustiques (Abid, 1989).

Dans notre étude, nous avons suivi le développement préimaginal d'*An. labranchiae* dans les conditions d'élevage au laboratoire d'Entomologie Médicale à l'Institut National d'Hygiène de Rabat et déterminer les principaux paramètres biologiques.

#### **II- DEVELOPPEMENT PRE-IMAGINAL**

Les résultats bruts de cet élevage sont consignés dans l'Annexe 3

##### **II-1 élevage de groupe**

L'élevage de groupe ne permettant pas de suivre avec précision le passage d'un stade larvaire à un autre, nous a permis de noter pour chaque lot, le nombre de larves atteignant l'état de nymphe, le nombre de nymphe devenant imago et le nombre de moustiques mâles et femelles.

##### **a- Eclosion des œufs**

L'étude de la première génération d'*An. labranchiae*, élevée au laboratoire, a permis de déterminer le nombre moyen d'œufs pondus dans les cages à  $m = 404 \pm 230$  (tableau16)

La durée d'incubation des œufs est de 48 h. Les larves de stade I, II, III et IV ont été dénombrées pour la détermination des différents paramètres de l'élevage.

Le rapport du nombre d'œufs éclos (NOE) par rapport au nombre d'œufs total récoltés (NOR) a permis de calculer le Taux d'éclosion (Te) ; il est de 70% (tableau 17).

**Tableau 17** : Taux d'éclosion observés expérimentalement chez *An. labranchiae*

(au laboratoire)

N° des plateaux	1	2	3	4	5	6	7	Total	Moyenne
<b>Nombre d'œufs récoltés</b>	200	300	280	700	700	150	500	2830	<b>404</b>
<b>Nombre d'œufs éclos</b>	150	218	200	330	680	114	256	1948	<b>278</b>
<b>Taux d'éclosion (Te) (%)</b>	75	73	71	47	97	76	51	491	<b>70</b>

**b- Production larvaires**

Durant le développement de différents stades larvaires, le taux de survie larvaire (TsL) a été calculé par rapport au nombre de larves qui arrivent au stade IV, il est estimé de 58% (Annexe 3).

**c- Développements nymphal**

Le taux de nymphose (Tn) (estimé à 46%) était calculé selon le rapport du nombre de nymphes obtenues par rapport au nombre obtenu des larves de stade 4.

**d- Production de l'élevage**

L'émergence des imagos d'*An. labranchiae* a lieu au laboratoire le soir. Le taux d'émergence (Tem) est calculé par le rapport du nombre d'adultes par rapport au nombre de nymphes obtenu, il est de 54 %.

La proportion de nymphes non écloses en fonction du nombre total de nymphe nous donne le taux d'inhibition de l'émergence (Tiem) qui est estimé à 46%.

En plus, la proportion de nymphes obtenues en fonction du nombre d'œufs éclos qui est de 25%, nous donne le rendement pré imaginal (Rpi)

Nous avons obtenu à partir des 278 larves de stade 1 constituant l'ensemble des lots. 209 moustiques dont 139 femelles et 70 mâles soit respectivement 33,49 % et 66,50% (tableau 18).

La proportion d'adultes obtenus en fonction du nombre d'œufs pondus nous donne le rendement global (Rg) qui présente 8%. Dans la génération F1, le sex-ratio est égal à 0,50.

**Tableau 18:** Sex-ratio de la génération F1 pour *An. labranchiae* élevé en insectarium.

	Mâles (%)	Femelles (%)	Effectifs
<b>La première génération de l'élevage : F1</b>	70 (33,49%)	139 (66,50%)	209

## II-2 Elevage individuel

### a- La durée des stades larvaires

La durée totale du développement pré imaginal de 10 larves de 1<sup>er</sup> stade suivi en élevage pour une seule génération est en moyenne de  $11,66 \pm 0,51$  jours.

Selon les conditions de laboratoire, la durée des différents stades larvaires est de (1,8 jours  $\pm$  0,42) pour le stade I, (2,40  $\pm$  0,69) pour le stade II, (2,4  $\pm$  0,51) pour le stade III et (2,1  $\pm$  0,31) pour le stade IV (tableau 19).

**Tableau 19 :** Evolution des larves d'*An. labranchiae* obtenue par élevage individuel

Jours N° lot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Durée du cycle préimaginal
1	St1	St1	St2	St2	St2	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Adulte	12
2	St1	St1	St2	St2	St2	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Adulte	12
3	St1	St1	St2	St2	St3	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Adulte	12
4	St1	St1	St2	St2	St2	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Adulte	12
5	St1	St1	St2	St2	St2	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Adulte	12
6	St1	St2	St2	St2	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Mort		11
7	St1	St1	St2	St2	St3	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Adulte	12
8	St1	St1	St2	St2	St3	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Mort	11
9	St1	St1	St2	St3	St3	St4	St4	St4	Nymphe	Mort		11
10	St1	St2	St2	St2	St3	St3	St4	St4	Nymphe	Mort		11

### II-3 Effet de deux types de nourriture sur la durée du cycle de développement

Le type de nourriture utilisé pendant le développement larvaire a une influence sur la durée du cycle de développement (Tableau 20). Dans le cas de nutrition par la poudre de Tetra fish food, la durée du cycle est estimée à une moyenne de  $12,33 \pm 0,51$  jours, alors que dans le cas de nourriture par les croquettes de viandes, la moyenne de la durée est de  $10,50 \pm 0,54$ . L'analyse des variances obtenues par le test ANOVA a montré que le résultat obtenu est statistiquement significatif ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

**Tableau 20** : Effet du type de nourriture sur la durée du développement préimaginale d'*An. labranchiae* au laboratoire

N° de Lot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Type de nourriture	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
durée du Cycle de développement en jour	10	10	11	10	11	11	13	12	12	12	12	13

A : croquettes de viande pour chat réduites en farine et finement tamisées

B : poudre de Tetra Baby Fish Food

Une analyse par régression linéaire a montré une corrélation statistiquement significative ( $p\text{-value} < 0,05$ ) de  $r^2 = 0,78$  avec un entre la nature de la nourriture et la durée du cycle de développement ont été analysées. Ce qui montre une corrélation modérée statiquement significative.

### III- DISCUSSION

L'observation de la productivité de l'élevage d'*An. labranchiae* a montré une difficulté d'adaptation aux conditions de laboratoire. La proportion des œufs éclos était de 70% dans notre 1<sup>ère</sup> génération. Ce taux estimé à 70% reste relativement élevé par rapport au taux moyen obtenu pour la génération F1 d'*An. arabiensis* en insectarium, qui est estimé à 54,4% (Diop *et al.*, 1998) et qui a augmenté de génération en génération. Nos résultats rejoignent ceux qui ont été rapportés par Armstrong *et al.*, (1961) dans son étude d'élevage en insectarium d'*An. gambiae sl* avec un taux d'émergence de 74%, mais les temps d'incubation reste différents.

La ponte des œufs s'est effectuée après 48h d'incubation, Himmi (2007) a indiqué ce même intervalle de temps qui a besoin les œufs d'*An. labranchiae* pour éclore dans les conditions naturelles. A l'opposé de l'*An gambiae sl*, pour qui l'éclosion des œufs s'est effectuée 4 jours après la ponte (Armstrong *et al.*, 1961). Le taux d'émergence obtenu en F1 (54%) peut être dû à la difficulté d'adaptation d'élevage au laboratoire. Malgré le bon entretien de notre insectarium, l'élevage des anophèles peut rencontrer certains problèmes dont les plus courants sont les contaminations par des bactéries et des champignons. Le taux de survie des stades préimaginaux, pour les larves de stade I ayant atteint le stade IV est de 58 %. Ce taux reste relativement faible par rapport au taux de 80% obtenu par Diop *et al.*, (1998), pour la génération F1 lors de l'élevage d'*An arabiensis*. Nos observations peuvent probablement être dues à la qualité et/ou à la quantité de l'aliment utilisé en élevage des larves. Il est connu chez les populations d'anophèles que les larves se dévorent entre elles au besoin. Aussi, les conditions de laboratoire qui peuvent permettre la prolifération microbienne. De plus, le taux d'émergence

d'adultes ne dépasse pas 54%, ce taux est faible comparé à celui d'*An arabiensis* estimé à 92 % en F1, ce qui leur permet d'obtenir un nombre suffisant d'anophèles pour l'obtention d'autres générations (Diop *et al.*, 1998), ce qui peut expliquer de plus le taux faible d'émergence d'adulte. Ce taux reste élevé par rapport à celui de la génération F1 d'*An arabiensis* (Ambene *et al.*, 1996). En revanche, le rendement globale reste relativement faible (8%), ceci est lié aux taux de mortalité élevés des larves au cours du cycle de développement préimaginaire. Nos résultats expliquent la difficulté du maintien continue des anophèles marocains, dans les conditions, de laboratoire pour l'obtention d'autres générations.

En insectarium, où la température a été maintenue entre 23 °C et 26 °C, la durée du cycle de développement pré imaginal d'*An labranchiae* varie de 10 à 13 jours avec une moyenne de 11,6 jours. Cette durée est de 10 à 14 jours pour *An. arabiensis*. Tandis que chez *An gambiae*, la durée du cycle de développement est d'une moyenne de 15,8 (Diop *et al.*, 1998). En général, les observations ultérieures réalisées sur le terrain pour les anophèles ont montré que la durée des stades larvaires est éminemment variable selon les conditions météorologiques, la température en particulier ; elle oscille entre 6 jours à plusieurs mois (Diop *et al.*, 1998). En outre, Holstein *et al.*, (1952) ont rapporté que la durée de développement préimaginal d'*An. gambiae* est influencée aussi par la température de l'eau, elle est de 6 à 8 jours pour une eau de 30 à 34 °C et de 12 à 16 jours pour une eau de 24 °C. Les différences concernant la durée de la vie préimaginaire ont été expliquées par Golvan (1983) qui a noté que plus la température de l'eau se rapproche de l'optimale (25 à 30 °C) pour l'espèce, plus l'évolution larvaire est rapide. Observation similaire a été rapportée par Mouchet et Carnevale (1991) qui ont noté qu'*An. gambiae* accomplit son cycle préimaginal en moins de 10 jours dans les mares temporaires ensoleillées où la température de l'eau dépasse 30 °C.

Par ailleurs, la durée du stade I et II est respectivement de 2 jours et 3 jours. Elle est de 2 jours pour les stades III, VI et stade nymphal. La même observation a été rapportée pour *An. arabiensis* et *An. gambiae sl* avec une durée de 2 jours (Diop *et al.*, 1998). Ce résultat rejoint celui trouvé dans la nature pour *An. labranchiae* et qui a été estimé de 2 à 3 jours (Bulletin de l'INH, 1949). En outre, le taux de mortalité nymphale de la génération F1 est de 46 %. Il est élevé, par comparaison avec celui qui a été trouvé en insectarium pour *An. gambiae sl*, et qui est de (0 % à 0,2 %). Mais nos résultats sont en accord avec ceux trouvés aux océanes de Dakar chez *An arabiensis* avec un taux de mortalité de 80 à 94% et un taux d'émergence de 6 à 20 %. Notre résultat peut être dû à la forte mortalité des anophèles pendant le stade d'éclosion car le moindre remous suffit à noyer les œufs.

La qualité et la quantité de la nourriture ont toujours joué un rôle pour la survie des anophèles. En effet, le manque de nourriture ou son inadaptation au mode de nutrition ou au régime des organismes en élevage peut provoquer la mortalité par inanition (Desfontaines *et al.*, 1991 ). Toutefois, la qualité de la nourriture des larves peut avoir une influence sur la durée du cycle de développement larvaire ; l'analyse statistique a montré une corrélation modérée avec  $r^2$  de 0,64 ( $p < 0,05$ ), ce qui a permis de déduire que l'alimentation des larves par des croquettes de viande peut remplacer celui de la poudre de Tetra Baby Fish Food ; cet aliment a toujours été montré comme le nutriment habituel des larves en élevage. Desfontaines *et al.*, (1991) ont montré l'influence de la qualité des aliments en insectarium sur l'émergence ; dans leur étude, le mélange de tétramine et de *Tetra Medica* a permis d'obtenir un fort pourcentage d'émergence dans un temps acceptable et pourrait remplacer celui à base de poudre de Tetra Baby Fish Food.

*An. labranchiae* est eurygame ce qui rend sa copulation au laboratoire difficile. Cependant, notre étude a permis d'obtenir une seule génération F1 dont le sex-ratio fût de 0,50 ; elle est similaire à celle rapportée par Brumpt (1949), qui a révélé que dans les élevages de larves et de nymphes, on obtient toujours un pourcentage sensiblement égal de moustiques mâles et femelles à condition de l'établir sur un nombre important de larves.

#### **IV- CONCLUSION**

La présente étude nous a permis de déterminer la durée de différents stades larvaires du cycle préimaginal en insectarium, et de montrer que l'élevage des larves et nymphe d'*An. labranchiae* est possible dans les conditions de laboratoire, bien que son entretien s'est avéré difficile à réaliser.

De plus, la production des larves d'*An. labranchiae* en élevage nous a permis, de préciser la durée des différents stades de développement de ce moustique et nous a éclairé sur certains paramètres de sa reproduction tels que: la ponte, le pourcentage d'éclosion, le sex-ratio etc. Par ailleurs, les résultats obtenus sur l'élevage d'*An. labranchiae* en insectarium ne peuvent en aucun cas être comparés à ceux observés dans les gîtes naturels soumis à des conditions bioclimatiques et prédateurs.

Toutefois, notre étude permettra une assez bonne approche de la biologie et des préférendums d'*An. labranchiae*, et nous permettra par conséquent de continuer à travailler sur l'élevage au laboratoire pour le réussir afin d'envisager de nombreux programmes de recherches entomologiques.

## CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

La réussite d'un programme de lutte contre le paludisme nécessite une connaissance préalable et approfondie de ses vecteurs. Dans cette optique, nous avons mené des recherches écologiques et des études moléculaires sur le complexe *Anopheles maculipennis* au nord du Maroc.

En effet, le complexe *Anopheles maculipennis* est l'un des groupes les mieux étudiés parmi les insectes vu son importance médicale. Le rôle du complexe dans la transmission du paludisme a motivé de nombreuses études de systématique et de taxonomie avec les outils classiques (morphologie, écologie) ou sur la base de caractères moléculaires. Ces travaux ont permis la découverte de nouvelles espèces, le démantèlement du complexe et la publication d'inventaires taxonomiques. Ces efforts ont été menés afin de cerner la dimension spécifique qui constitue le niveau taxonomique central en biologie et aussi dans le but d'élucider le rôle de chaque espèce dans l'épidémiologie du paludisme.

Au cours de ce travail, et dans un premier temps, l'identification moléculaire par la PCR multiplex des anophèles appartenant au complexe *Anopheles maculipennis* récoltés du nord du Maroc a montré la présence d'une seule espèce qui est *An. labranchiae*.

D'un autre côté, le séquençage de l'ADN mitochondriale d'*An. labranchiae* provenant du Maroc et de l'Algérie a montré une grande similitude génétique entre les deux populations de ces deux pays.

Par ailleurs, la caractérisation spatiale d'*An. labranchiae* a révélé que les conditions parfaites de développement de ce vecteur du paludisme, semblent être les habitats aquatiques à faible profondeur, avec un pH neutre, une faible turbidité et qui abritent suffisamment de plantes émergentes telles que *Oryza sativa*.

Et finalement, l'étude préliminaire de l'élevage d'*An. labranchiae* au Laboratoire d'Entomologie Médicale a été très difficile à réaliser, elle n'a pas pu être menée d'une façon continue et ceci est dû à la difficulté de l'accouplement de ce moustique à l'insectarium, ce qui n'a permis d'obtenir qu'une seule génération F1. Cependant, l'analyse de la phase pré-imaginale a permis de déterminer les paramètres biologiques de la première génération: 70 % pour le taux d'éclosion, 54 % pour le taux d'émergence, 46 % pour le taux de nymphose, 25 % pour le rendement pré-imaginal et 46 % pour le taux d'inhibition de l'émergence avec un sex-ratio de 0,5.

L'identification précise du vecteur du paludisme reste primordiale pour l'épidémiologie de la maladie. La recherche de caractères moléculaires, toujours associés à l'étude morphologique, s'avère utile pour préciser les différences inter et intraspécifiques et tenter de mettre en évidence de nouvelles interventions de lutte antivectorielle.

Les informations obtenues par cette étude permettent d'envisager de nouvelles perspectives pour la surveillance des populations vectrices et par la mise en place de projets de lutte intégrant des techniques nouvelles. Ainsi, nous pensons, qu'il sera souhaitable :

- D'entreprendre une étude plus vaste sur toute la gamme d'espèces, y compris d'autres populations dans le nord de l'Afrique (Algérie, Maroc et Tunisie). Idéalement, une étude plus détaillée avec une approche par la génétique des populations pour déterminer les origines de l'espèce et le flux génétique entre les populations nord et sud du bassin méditerranéen.
- Mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des anophèles à leur environnement pour mieux prévenir leur expansion en zone urbaine ;
- D'intégrer les méthodes de biologie moléculaire pour l'identification des espèces anophéliennes comme technique de routine à côté des méthodes d'identification morphologique

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abid, Salem., 1989.** Essais d'élevage des Anophèles impliqués dans la transmission du paludisme maghrébin : *A. labranchiae*, *A. multicolor*, *A. sergenti* (s.l.) (Culicidae, Anophelinae) et essais d'infection expérimentale par des souches tropicales de *P. falciparum* cultivées invitro, Mémoire DEA ; Université Montpellier I, Faculté de Médecine. 34 p.
- **Adamovic, Z., 1986.** The brackish water anopheline mosquitoes in Yugoslavia. *Acta Entomologica Jugoslavica*. 20: 19-26.
- **Adamovic, Z & Paulus, R., 1984.** A survey of the anopheline mosquitoes (Diptera, Culicidae) in Srednja Posavina, Yugoslavia. *Acta Veterinaria (Beograd.)* 34: 199-204.
- **Adamovic, Z & Paulus, R., 1985.** Anopheline species (Diptera, Culicidae) in the region of Zagreb, Croatia. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 35: 157-162.
- **Adamovic, Z & Paulus, R., 1987.** The indoor resting anophelines in the Istria Peninsula, Yugoslavia. *Bulletin de l'Academie Serbe des Sciences et des Artes. Classe des Sciences, Mathematiques et Naturelles*. 93: 91-98.
- **Aditya, G., Pramanik, M.K. & Saha, G.K., 2006.** Larval habitats and species composition of mosquitoes in Darjeeling Himalayas, India. *Journal of Vector Borne Diseases*, 43: 7-15.
- **Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C.A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor, M. F., 2005.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 52 (5): 399-45.
- **Akiner, M.M. & Caglar, S.S., 2010.** Identification of *Anopheles maculipennis* group species using polymerase chain reaction (PCR) in the regions of Birecik, Beyşehir and Cankiri. *Turkiye Parazitol Derg*. 34(1):50-4.
- **Alten, B., Caglar, S S & Ozel, O., 2000.** Malaria and its vectors in Turkey. *European Mosquito Bulletin*. 7: 27- 33.
- **Ambene Awono, P.H., 1996.** Bioécologie préimaginale d'*Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) dans les céanes (puits maraîchers) de Dakar Mém DEA (06.07.96), Faculté des Sciences & Technologies, Université UCAD, Dakar, Sénégal. 83p.
- **Ameziane, N., Bagard, M., Lamoril, J., 2006.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique: 705p.
- **Anfreville, L., 1916.** Les moustiques de Sale, Maroc. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 9: 104–142.
- **Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L. and Corbellino, M., 2012.** "Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*". *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 4(1): e2012013.

- **Armstrong, J & Bransby-William, W.R., 1961.** The maintenance of a colony of *Anopheles gambiae*, with observations on the effects of changes in temperature. *Bull OMS*. 24: 427-43.
- **Azari-Hamidian, S., Linton, Y.M., Abai, M.R., Ladonni, H., Oshaghi, M.A., Hanafi-Bojd, A.A., Moosa-Kasemi, S.H., Shabkhiz, H., Pakari, A., Harbach, R.E., 2010.** Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna of the Iranian islands in the Persian Gulf. *J. Nat. Hist.* 44: 913–925.

**-B-**

- **Bailly-choumara H., 1973.** Etude préliminaire d'une récolte d'*Anopheles labranchiae* par piège CDC réalisée dans la région de Larache, Maroc. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*. 49: 49-55.
- **Ball, S.L., Armstrong, K.F., 2006.** DNA barcodes for insect pest identification, a test case with tussock moths (Lepidoptera, Lymantriidae). *Can. J. Forest Res.* 36: 337–350.
- **Bates, M., 1940.** The nomenclature and taxonomic status of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex. *Annals of the Entomological Society of America*. 33: 343-356.
- **Bates, M. & Hackett, L.W., 1939.** The distinguishing characteristics of the populations of *Anopheles maculipennis* found in southern Europe. *Verhandlungen des VII internationalen Kongresses fur Entomologie*. 3: 1555-1569.
- **Becker, N., Petric, D., Boase, C., Lane, J., Zgomba, M., Dahl, C., Kaiser, A., 2003.** Mosquitoes and their control New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- **Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A., 2010.** Mosquitoes and their control, XXX, 578p, ISBN / 978-3-540-92873-7 Berlin: Springer;.
- **Belqat, B., 2002.** Etude systématique écologique biogéographique caryologiques des simulies (Diptera simuliidae) du Maroc cas particulier du Rif. Thèse es-Sci, Univer Abdelmalek, Fac Scien Tetouan, 322p
- **Benhoussa, A., Aguesse, P.P. & Dakki, M., 1993.** Microdistribution larvaires de trois populations de Simulies (Insecta, Diptera) de l'Oued BouRegreg. *Vie et Milieu*. 43 (4) : 247-253
- **Benmanssour, N., Laaziri, M. & Mouki, B. 1972.** Note sur la faune anophélienne du Maroc. *Bull. Inst. Hyg. (Maroc)*. 52: 103-112.
- **Bentley, M.D., Day, J.F., 1989.** Chemical ecology and behavioural aspects of mosquito oviposition. *Annu Rev Entomol.* 34: 401-421.
- **Benzecri, J.P., 1973.** l'analyse des données II: Analyse des correspondances. Dunot édit. Paris. VII. 619p.
- **Bianchi, U., 1968.** Sulla tassonomia di *Anopheles labranchiae* et *Anopheles atroparvus*. *Riv. Parasitol.* 29 : 221–226.
- **Blazquez, J. & De Zulueta, J., 1980.** The disappearance of *Anopheles labranchiae* from Spain. *Parassitologia*. 22: 161-163.

- **Boccolini, D., Di Luca, M., Marinucci, M. & Rorni, R., 2003.** Further molecular and morphological support for the formal synonymy of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis with *A. melanoon* Hackett. *European Mosquito Bulletin*. 16: 1-5.
- **Bogenhagen, D & Clayton, D.A., 1974.** The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem*. 249: 7991-7995.
- **Bonjean, M., 1947.** L'épidémiologie du paludisme au Maroc. *Bull. Inst. Hyg. (Maroc)*. 7: 1-119.
- **Boyd, M.F., 1949.** *Malanology*. W.B. Saunders comp. Philadelphia and London, 1643 p.
- **Bruce-Chwatt, L.J. & De Zulueta, J., 1980.** The rise and fall of malaria in Europe. A historico-epidemiological study. Oxford University Press, Oxford. 240 pp.
- **Brumpt, E., 1949.** Précis de Parasitologie Masson et Cie éditeurs, Paris: 2138p
- **Brunhes, J., Rhain, A., Geoffroy, X & Mervy, J.P., 2000.** Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne logiciel d'identification et d'enseignement. Montpellier France, IRD et IPT, CD-Rom collection didactique Ed IRD.
- **Bullini, A.P.B., Cianchi, R., Sabatini, A., Coluzzi, M. & Bullini, L., 1980.** Ricerca elettroforetica su specie paleartiche del complesso *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae), *Atti XII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Roma*. Pp : 255-259
- **Bulletin de l'Institut National d'Hygiène du Maroc., 1949.** Manuel du chef de secteur antipaludique au Maroc Fascicule II Anopheles ed Félix Moncho

-C-

- **Callot, J., 1940.** Sur quelques moustiques du Maroc. *Arch. Inst. Pasteur (Maroc)*. 2:361-365.
- **Carneval, P. & Robert, V., 2009.** Les anophèles Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. Éditions Institut de Recherche pour le Développement. 391p
- **Chahed, M.K., Bouratbine, A., Krida, G., Ben Hamida, A., 2001.** Receptivity of Tunisia to malaria after its eradication: analysis of the situation for adequacy of the surveillance. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 94 : 271-276.
- **Charrier, H., 1924.** Les moustiques de la région de Tanger. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 17 : 570-572.
- **Chauvet, G., Davidson, G & Dejardin, J., 1969.** Validité d'une méthode chétotaxique de distinction des larves d'espèce A et B du complexe *Anopheles gambiae* à Madagascar. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. *Ent. méd. et Parasitol*. 7(1) : 51-60.
- **Chin, W., Contacos, P.G., Coatney, R.G., Kimbal, H.R., 1965.** Naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*. 149:865
- **Cianchi, R., Sabatini, A., Bullini, L. & Coluzzi, M., 1981.** Differenziazione morfologica e genetica nei complessi *Anopheles maculipennis* e *Anopheles claviger*. *Parassitologia* 23: 158-163.
- **Coluzzi, M. & Sabatini, A., 1995.** *Diptera Culicomorpha*. In: *Checklist delle specie della fauna italiana*. Ed Minelli, A, Ruffo, S. & La Posta, S. Comitato Scientifico per la fauna d'Italia. 65: 9-11.

- **Collins, F.H. et Paskewitz, S.M., 1996.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.* 5(1): 1-9.
- **Crick, F.H.C., 1970.** Central dogma of molecular biology. *Nature.* 227: 561-563
- **Cywinska, A., Hunter, F.F., Hebert, P.D.N., 2006.** Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med. Vet. Entomol.* 20: 413-424.

**-D-**

- **Dakki, M., 1985.** Sur le choix des données en biotypologie des eaux courantes par l'analyse factorielle des correspondances *Bull Ecol.* 16(4) : 285-296
- **De Buck, A., Schoute, E & Swellengrebel, N.H., 1930.** Racial differentiation of *Anopheles maculipennis* in the Netherlands and its relation to malaria. *Riv. Malariol.* 9: 97-110.
- **De Buck, A., Schoute, E. Lk & Swellengrebel, N.H., 1932.** Further investigations on the racial differentiation of *Anopheles maculipennis*, the Netherlands and its bearing on malaria. *Riv Malariol.* 11: 137-156.
- **De Zulueta, J., Ramsdale, C., Cianchi, R., Bullini, L., Coluzzi, M., 1983.** Observations on the taxonomic status of *Anopheles sicaulti*. *Parassitology.* 23: 73-92.
- **Delanoe, P., 1917.** Contribution à l'étude du paludisme au Maroc occidental. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 10 : 586-690.
- **Desfontaine, M.A., Tchikangwa, I., LE goff, G., Robert, V & Carnevale, P., 1991.** Influence de l'alimentation des larves d'*anopheles gambiae* (Diptera Culicidae) sur le développement préimaginal en insectarium, *Bull, Liais, doc OCEAC* n° 98.
- **Diop A, Faye O & Molez J.F., 1998.** Mise en place d'un insectarium d'une souche d'*Anophèles arabiensis*, Entomologie médicale, manuscrite n° 1917.
- **Djadid, N.D., Gholizadeh, S., Tafsi, E., Romi, R., 2007.** Molecular identification of Palaearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. *Malar. J.* 6 : 6-16.
- **Djossou, F., Thiebaut, R., Le Bras, M., 2000.** Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic dans Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris, Elsevier. 8-507-A-20.

**-E-**

- **Ed & Et Sergent., 1928.** Arch Inst Pasteur d'Algérie. 6 : 296 - 328
- **Edillo, F.E., Toure, Y.T., Lanzaro, G.C., Dolo, G., Taylor, C.E., 2002.** Spatial and habitat distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani Village, Mali. *Journal of Medical Entomology.* 39: 70-77.
- **El Alami El Moutawakil, M., 2002.** Taxonomie, Ecologie et biogéographie Ephéméroptères du Rif. Thèse d'Etat es-Sciences Université Abdelmalek Saadi, Fac des Sciences Tétouan, 401pp
- **El Alaoui, M.H., 1985,** Contribution à l'étude de la faune culicidienne dendrolimnique de la Suberaie en pays Zaer (Maroc) Aspect écophysiological, *DEA Uni. P. Sabatier*, Toulouse. 86pp

-F-

- **Fairely, N.H. 1947.** Sidelight on malaria in man obtained by subinoculation experiments, *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 40: 621-676.
- **Falleroni, D., 1926.** Fauna anofelica italiana e suo "habitat" (paludi, risae, canali). Metodi di lotta contra la malaria. *Rivista di Malariologia*. 5: 553-593.
- **Falleroni, D., 1932.** Zooprofilassi e sua applicazione in Ardea. (Argo Romano). Diverse razze di "A. maculipennis". Roma. Tipografia Cuggiani. (not seen).
- **Fantini, B., 1994.** Anophelism without malaria: an ecological and epidemiological puzzle. *Parassitologia*. 36: 83-106.
- **Faraj, C., Ouahabi, S., Adlaoui, E., Elaouad, R., 2010.** Etat actuel des connaissances sur les anophèles du Maroc (Diptera: Culicidae) : systématique, distribution géographique et compétence vectorielle, *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*. 58 : 349-357
- **Faraj, C., Ouahabi, S., Adalaoui, E., Boccolini, D., Romi, R., El Aouad, R., 2008a.** Risque de réémergence du paludisme au Maroc: Etude de la capacité vectorielle d'*Anopheles labranchiae* dans une zone rizicole au nord du Pays. *Parasite*. 15 : 605-610.
- **Faraj, C., Adlaoui, E., Brengues, C., Fontenille, D. & Lyagoubi, M., 2008b.** Résistance d'*Anopheles labranchiae* au DDT au Maroc : identification des mécanismes et choix d'un insecticide de remplacement, *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*. 14(4): 776-783.
- **Faraj, C., Adlaoui, E., Saaf, N., Romi, R., Boccolini, D., Di Luca, M., Lyagoubi, M., 2004.** Note sur le complexe *Anopheles maculipennis* au Maroc. *Bull. Soc. Path. Exot*, 97: 293-294.
- **Favr. 1903.** An attempt to study malaria in Russia from the point of view of sanitation. (In Russian). Kharkov, 344 pp. (not seen).
- **Foley, D.H., Rueda, L.M., Wilkerson, R.C., 2007.** Insight into global mosquito biogeography from country species records. *J. Med. Entomol.* 44, 554-567.
- **Frizzi, G., 1947a.** Cromosomi salivari in *Anopheles maculipennis*. *Sci. Genet.* (Turin). 3: 67-69.
- **Frizzi, G., 1947b.** Salivary gland chromosomes of *Anopheles*. *Nature*. 160: 226-227.
- **Frizzi, G., 1951.** Dimorfismo cromosomico in *Anopheles maculipennis messeae*. *Scientia genet.* 4:79-93.
- **Frizzi, G., 1953.** Étude cytogénétique d'*Anopheles maculipennis* en Italie. *Bulletin of the World Health Organization*. 9: 335-344
- **Frizzi, G., 1956.** Studio della fauna anofelica nella piana di Valencia (Spagna). *Boll. Zool.* 23: 405-411.

-G-

- **Gaffigan, T.V. & Ward, R.A., 1985.** Index to the second supplement of the "A catalog of the mosquitoes of the World" with corrections and additions (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*. 17: 52-63.

- **Gaud, J., 1953.** Notes biogéographiques sur les culicidés au Maroc. *Arch. Inst. Past. (Maroc)*, IV (7) : 443-490.
- **Gaud, J., Mechali, D. & Delrieu, J., 1949.** Riziculture et paludisme au Maroc. *Bulletin de l'Institut d'Hygiène du Maroc*. 9: 181–190.
- **Gaud, J., Faure, F. & Maurice, A., 1950.** Répartition et fréquence relative des espèces anophéliennes au Maroc. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 25 : 53-60.
- **Gaud, J., Laurent J & Duppy, R., 1952.** Association d'Anophèles avec d'autres culicidés dans les mêmes gîtes larvaires du Maroc. *Bull Ins Hyg Maroc*, 12, 1-2, 77-82.
- **Gentile, G., Slotman, M., Ketmaier, V., Powell, J. R. & Caccone, A., 2001.** Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae s.s.* *Insect. Mol. Biol.*, 10 (1): 25-32.
- **Gentile, G., Della Torre, A., Maegga, B., Powell, J.R. & Caccone, A., 2002.** Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae s.s.*, and the problem of taxonomic status. *Genetics*, 161, 1561-1578.
- **Gilles, H.M. & Warrell, D.A., 1993.** Bruce-Chwatt's essential malariology. Edward Arnold, third edition oxford university Press London, p 340.
- **Gimning, J.E., Ombok, M., Otieno, S., Kaufman, M.G., Vulule, J.M. & Walker, E.D. 2002.** Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. *Journal of Medical Entomology*. 39: 162–172.
- **Gonzalez, R., Carrejo, N., Wilkerson, R.C., Alarcon, Y.A., Alarcon-Ormasa, J., Ruiz, F., Bhatia, R., Loaiza, J., Linton, Y.M., 2010.** Confirmation of *Anopheles* (*Anopheles*) *calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 105: 1001–1009.
- **Gordeev, M., Goriacheva, I.I, Shaikévitch, E. & Ejov, M., 2004.** Intra specific variability of the second internal transcribed, spacer of the ribosomal DNA among five Palaearctic species of anopheline mosquitoes. *European Mosquito Bulletin*. 17: 14-19.
- **Gordeev, M.I., Zvantsov, A.B., Goriacheva, I.I., Shaikévich, E.V. & Ezhov, M.N., 2005.** Description of the new species *Anopheles artemievi sp.n.* (Diptera, Culicidae). *Meditinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*. 2: 4-5.
- **Gordeev, M.I, Goriacheva, I.I., Shaikévich, E.V., Zvantsev, A.B., Ezhov, M.N., 2006.** The malaria mosquitoes (Diptera, Culicidae, Anopheles) of the Amudarya river valley. *Med Parazitol (Mosk)*. 1: 25-30.
- **Gordeev, M., Zvantsov, A.B., Goriacheva, I.I., Shaikévich, E.V., Ezhov, M.N., Usenbaev, N., Shapieva, Zh .Zh., Zhakhongirov, Sh .M., 2008.** Anopheles mosquitoes (Diptera, Culicidae) of the Tien Shan: morphological, cytogenetic, and molecular genetic analysis. *Meditinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni*. 3: 25-32.
- **Grassi, B., Bignami, A., & Bastianelli, G., 1899.** Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo del zanzarone. *Atti Reale Accademia dei Lincei*, S 5, 8: 21.

- **Grenier, P., 1960.** *La notion d'espèce dans la "nouvelle" systématique.* Document ronéo O.R.S.T.O-M.
- **Grjebine, A., Coz, J. Elouard, J.M., Mouchet, J & Rageau, J., 1976.** La notion d'espèces chez les moustiques : Etude des quatre complexes Les problèmes de l'espèce dans le règne animal sous la direction de Charles BOCQUET, Jean GÉNÉRMONT et Maxime LAMOTTE. *Tome I* Mémoire n° 38 de la Société Zoologique de France, Gustav F.V. 389–395.
- **Guy, Y., 1959.** Les Anophèles du Maroc. *Mem. Soc. Sci. Nat. Phys. Zool. (Maroc).* 7: 235.
- **Guy, Y., 1963.** Bilan épidémiologique du paludisme au Maroc (données recueillies entre 1960, 1961 et 1962). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 38 : 823–857.
- **Guy, Y. & Holstein, M., 1968.** Données récentes sur les Anopheles du Maghreb. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 46: 146–150.
- **Guy, Y., Salières, A., Boesiger, E., 1976.** Contribution à l'étude du «complexe *maculipennis*» (*Diptera – Culicidae – Anophelinae*). Mise au point en 1975. *Annal. Biol.* 15 : 225-282.

**-H-**

- **Hervy, J.P., Le Goff, G., Geoffroy, B., Hervé, J.P., Manga, L., Brunhes, J., 1998.** Les anophèles de la région afro-tropicale Orstom éditions, Coll. Didactiques, CD-Rom.
- **Habirov, Z., Kadamov, D., Iskandarov, F., Komilova, S., Cook, S., McAlister, E., Harbach, R.E., 2012.** Malaria and the Anopheles mosquitoes of Tajikistan. *J Vector Ecol.* 37(2): 419-27.
- **Hackett, L.W., 1934.** The present status of our knowledge of the sub-species of *Anopheles maculipennis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 28: 109-140
- **Hackett, L.W., 1937.** *Malaria in Europe.* London, Oxford University Press.
- **Hackett, L.W. & Missiroli, A., 1935.** The varieties of *Anopheles maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe. *Rivista di Malariologia.* 14: 45-109.
- **Hackett, L.W. & Lewis, D.J., 1935.** A new variety of *Anopheles maculipennis* in southern Europe. *Rivista di Malariologia.* 14: 377-383.
- **Hackett, L.W., Martini, E. & Missiroli, A., 1932.** The races of *A. maculipennis*. *American Journal of Hygiene.* 16: 137-162.
- **Hadjinicolaou, J. & Betzios, B., 1973.** Resurgence of *Anopheles sacharovi* following malaria eradication. *Bulletin of the World Health Organization.* 48: 699-703.
- **Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006.** DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 968–971.
- **Hammadi, D., Boubidi, S.C., Chaib, S.E., Saber, A., Khechache, Y., Gasmi, M. & Harrat Z. 2009.** Le paludisme au Sahara Algérien, *Bull Soc Pathol Exot.* 102 (3) : 185-192
- **Harbach, R.E., 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research* 94: 537-553.
- **Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., De Waard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313–321.

- **Himmi, O., 1991.** Culicidae (Diptera) du Maroc : Clé de détermination actualisée et étude de la dynamique et des cycles biologiques de quelques populations de la région de Rabat-Kénitra. Thèse doct. 3ème cycle, Université Mohammed V, Fac. Sci., Rabat, 185 p.
- **Himmi, O., 2007.** Les culicidés (Insectes, Diptères) au Maroc : Systématique, écologique et études épidémiologiques pilotes, Doctorat d'Etat. Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat, 288pp
- **Hogg, I.D. & Hebert, P.D.N., 2004.** Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.* 82: 749-754.
- **Holstein, M., 1949.** Guide pratique de l'anophélisme en A.O.F. Dakar, Direction generale de la Sante publique, 55 p.
- **Holstein, M.H., 1952.** Biologie d'*Anopheles gambiae*- recherche en Afrique occidental Française OMS série monographies OMS Ed Genève. 9 : 176p
- **Holstein, M., Le Corroller, Y., Addadi, K. & Guy, Y., 1970.** Contribution à la connaissance des anophèles du Sahara. *Arch. Inst. Pasteur Alger* ; 48 : 7-15.
- **Hunt, R.H., Coetzee, M., Fettene, M., 1998.** The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92: 231-235
- **Hwang, U.W. & Kim, W., 1999.** General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasitol.* 37: 215-28.

**-J-**

- **Jaenson, T.G.T., Lokki, J. & Saura, A., 1986.** *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and malaria in northern Europe, with special reference to Sweden. *Journal of Medical Entomology.* 23: 68-75.
- **Jetten, T.H. & Takken, W., 1994.** Anophelism without malaria in Europe. A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. *Wageningen Agricultural University Papers.* 94- 95.

**-K-**

- **Kasap, M., 1990.** Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 42: 111–117.
- **Knell, A.J., 1991.** Malaria the Welcome Trust Oxford University Press p 91.
- **Korvenkontio, P., Lokki, J., Saura, A. & Ulrnanen, I., 1979.** *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in northern Europe: species diagnosis by egg structure and enzyme polymorphism. *Journal of Medical Entomology.* 16: 169-170.
- **Keshishyan, M.N., 1941.** The Culicidae of Tajikistan. *Med. Parazitol. Parazit. Bolezni.* 10: 77–80.

- **Kengne, P., Awono-Ambene, P., Antonio-Nkondjio, C., Simard, F. & Fontenille, D., 2003.** Molecular identification of members of the *Anopheles nili* group, African malaria vectors. *Med. Vet. Entomol.* 17:1-9.
- **Krida, G., Bouattour, A., Rhaim, A., el Kebir, A., Jlidi, R., 1998.** Preliminary investigation of four *Anopheles* larvae samples susceptibility to chlorpyrifos in Tunisia. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 75: 199–203
- **Kronefeld, Mandy., Marko, Dittmann., Dorothee, Zielke., Doreen, Werner & Helge Kampen., 2012.** Molecular confirmation of the occurrence in Germany of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae), *Parasites & Vectors.* 5: 250
- **Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R., Jambuligam, P., 2007.** DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44: 1-7.

-L-

- **Laboudi Majda, Faraj Chafika, Sadak Abderrahim, Harrat Zoubir, Boubidi Said Chawki, Harbach Ralph E., El Aouad Rajae, Lintonbn Yvonne-Marie., 2011.** DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*. *Journal Acta Tropica*, 118: 6-1.
- **Laboudi Majda, Faraj Chafika, Sadak Abderrahim, Azelmate Mustapha, Rhajaoui Mohamed, El-Aouad Rajae., 2012.** Some environmental factors associated with *Anopheles labranchiae* larval distribution during summer 2009, in Larache province, Morocco *Journal African Entomology*, 20:2.
- **Laboudi Majda, Sadak Abderrahim, Ouahabi Souad, Boccolini Daniela, Faraj Chafika.** Molecular characterization of *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Northern Morocco. *Journal Faunistic Entomology*, accepté 2013
- **Lane, P. R. & Crosskey, R. W., 1993.** Medical insects and arachnids. *Chapman and Hall*, 723p.
- **Langeron, M., 1938.** Anophèles du grand Atlas et de l'Anti Atlas Marocain. C R, Académie Sciences, CCVIII: 260–262, idem. *Arch. Inst. Pasteur Maroc.* 2: 357.
- **Laveran, A., 1880.** Note sur un nouveau parasite trouve dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull. Acad. Méd.*, 2e serie, 9 : 1235-1236.
- **Legendre, L. & Legendre., P., 1984.** Ecologie numérique. le traitement multiple des données écologiques Masson Paris T1, XIV, 179p et T2, VIII, 254p
- **Linton, Y.M., Smith, L. & Harbach, R.E., 2002a.** Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis and *Anopheles melanoon* Hackett. *European Mosquito Bulletin.* 13: 1-7.
- **Linton, Y.M., Smith, L. & Harbach, R.E., 2002b.** Molecular confirmation of sympatric populations of *Anopheles messeae* and *Anopheles atroparvus* overwintering in Kent, southeast England. *European Mosquito Bulletin.* 13: 8-16.

- **Linton, Y.M., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Samanidou-Voyadjoglou, A., Harbach, R.E., 2007.** The *Anopheles (Anopheles) maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. *Journal of Natural History*. 41: 2683-2699.
- **Linton, Y.M., Smith, L., Koliopoulos, G., Samanidou- Voyadjoglou, A., Zounos, A.K. & Harbach, R.E., 2003.** Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of the maculipennis complex. *Systematic Entomology*. 28: 39-55
- **Linton, Y.M., Lee, A.S. & Curtis, C., 2005.** Discovery of a third member of the Maculipennis Group in SW England, *European Mosquito Bulletin*. 19: 5-9.
- **Louah, A., Ramdani, M., Saoud, Y. & Mahjour, J., 1995.** Biotypologie de la faune culicidienne de la péninsule tingitane. *Bulletin Institut Scientifique de Rabat*. 18: 93–102.

-M-

- **Macgregor, M.E., 1929.** The significance of the pH in the development of mosquito larvae. *Parasitology*. 21: 132–157.
- **Manguin, S., Mouchet, J., Coosemans, M., 2001.** Identification moléculaire d'espèces jumelles d'anopheles exemples des complexe *Anopheles minimus* et *Anopheles dirus* vecteurs majeurs du paludisme en Asie du Sud-Est. *Med trop*. 61: 463- 469.
- **Manguin, S., Fontenille, D., Chandre, F., Lochouarn, L., Mouchet, J., Kengne, P., Guillet, P., 1999.** Génétique des populations anophéliennes. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 92: 229- 235.
- **Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Di Luca, M. & Severini, C., 1999.** Phylogenetic relationships of seven Palaearctic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence data. *Insect Molecular Biology*. 8: 469-480.
- **Maurille, S., 2005.** Les substances répulsives dans la protection du voyageur contre les piqûres d'arthropodes hématophages: étude comparée du DEET (N,N-diéthyl-m-toluamide). Thèse d'exercice : pharmacie. Faculté de pharmacie d'Angers. 92p.
- **Meigen, J.W., 1818.** Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweifltigelligen Insekten. Aachen. 1: ixxxvi, 153.
- **Metge, G. & El Alaoui, M., 1987.** Étude de la dynamique des populations d'*Aedes echinus* (culicidé dendrolimnique) en écophase aquatique au Maroc. *Annals of Limnology* 23: 129–134.
- **Miles, S. J. 1979.** Abiotchemical key to adult member of the *Anopheles gambiae* group of species (Diptera: Culicidae). *J. Med. Hyg.*, 15: 297-299.
- **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 Tropical of Medicine and Hygiene*. 61: 1010–1016.
- **Ministère de la santé., 1996 :** Lutte antipalludique, guide des activités. 205p.

- **Ministère de la santé., 2004.** Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Rapport annuel d'activités.
- **Ministère de la santé., 2007.** Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies. Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Rapport annuel d'activités.
- **Ministère de la santé., 2010.** Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies. Billan des activités des programmes de lutte contre les maladies parasitaires.
- **Missiroli, A., 1935.** Nuova varietà *Anopheles maculipennis*. *Ann. Ig. (Sperm)*. 45: 22.
- **Missiroli, A., Hackett, L.W. & Martini, E., 1933.** Le razze di *Anopheles maculipennis* e loro importanza nella distribuzione della malaria in alcune regioni d'Europa. *Rivista di Malariologia* 12: 1-56.
- **Mouchet, J. & Carnevale, P., 1991.** Les vecteurs et la transmission. In Paludisme. *Ellipses. AUPELF UREF*. Paris: 240p.
- **Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., Sircoulon, J., 2004.** Biodiversité du paludisme dans le monde. Ed John Libbey Eurotext, Paris France. 428 p
- **Moussiegt, O., 1986.** Moustiques de France ; *Bibliographie et répartition*. SFF/MNHN. 184 p.

-N-

- **Naji, M., Omari, M., El Mellouki, W., Agoumi, A., Benmansour, N., Baaj A., Nejmi, S., 1985.** le paludisme d'importation au maroc (à propos de 140 cas). *Revue internationale des Services de santé des armées de terre, de mer et de l'air*. 58 (4): 241-243.
- **Nicolescu, G., Linton, Y.M., Vladimirescu, A., Howard, T.M. & Harbach, R.E., 2004.** Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence. *Bulletin of Entomological Research*. 94: 525-535.
- **Nikolaeva, N., 1996.** Resurgence of malaria in the former Soviet Union (FSU). *Soc. Vector Ecol. News*. 27: 10-11.
- **Novikov, Yu.M & Alekseev, A.N., 1989.** The N.E. limit of the territory of *Anopheles maculipennis* and the S.W. limit of the territory of *An. beklemishevi*. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolnezi*. 1: 16-19.

-O-

- **Oaks, S.S, Mitchell, V.S, Pearson. G.W & Carpenter C.C.J., 1991.** Malaria obstacles and opportunities , Washington DC National Academy Press, Pp 309

- **Olivio, P.D., Van de Walle, M.J., Laipis, P.J., Hauswirth, W.W., 1983.** Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature*. 306: 400-402.
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2003.** Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs : Guide du stagiaire. *Edition provisoire. WHO/CDS/CPE/SMT/2003*. 18: 102p.
- **Organisation mondiale de la Santé (OMS), 2007.** Le paludisme au Maroc, une lutte sans relâche, une perspective d'élimination WHO-EM/MAL/345/F.
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2011.** Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde ([http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/fr/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/fr/))
- **Oshaghi, M.A., Sedaghat, M.M, Vatandoost, H., 2003.** Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 9(4): 659–666.
- **Oshaghi, M.A., Yaaghoobi, F., Abaie, M.R., 2006.** Pattern of mitochondrial DNA variation between and within *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) biological forms suggests extensive gene flow. *Acta Tropica*. 99 : 226-233.

**-P-**

- **Pages, F., Orlandi-Pradines, E., Corbel, V., 2007.** Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle Vectors of malaria: biology, diversity, prevention. and individual protection. *Médecine et maladies infectieuses*. 37: 153-161.
- **Pemola Devi, N. & Jauhari, R.K., 2007.** Mosquito species associated within some western Himalayas phytogeographic zones in the Garhwal region of India. *Journal of Insect Science*. 7: 1-10.
- **Postiglione, M., Bruno-Smiraglia, C., Lavagnino, A., Gokberk, C. & Ramsdale, C., 1970.** A preliminary note on the occurrence in Turkey of the *subalpinus* form of the *A. maculipennis* complex. *Rivista di Parassitologia*. 31: 155-158.
- **Proft, J., Maier, W., Kampen, H., 1999.** Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction assay. *Parasitology Research*, 85: 837-843.
- **Pruthi., 1931.** Preliminary observations on the influence of different concentrations of hydrogen ions and temperatures of water on mosquito larvae. *Indian Jour Med Res*: 131-135

**-Q-**

- **Qninba, A., El agbani, M.A., Dakki, M & Benhoussa, A., 1988.** Evolution saisonnière de quelque peuplement d'invertébrés benthiques à l'ouest bouregreg, *Bull Inst Sci*. 12: 149-156.

-R-

- **Rajmankova, E., Savage, H.M., Rodriguez, M.H., Roberts, D.R., Rejmanek, M., 1992.** Aquatic vegetation as a basis of classification of *Anopheles albimanus* Weideman (Diptera: Culicidae) larval habitats. *Environmental Entomology*. 21: 598-603.
- **Rajnikant, Pandey S.D., Sharma, S.K., 1996.** Role of biological agents for the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian Journal of Malariology*. 33: 209 - 215.
- **Ramdani, M., 1986.** Ecologie des crustacées copépodes Cladocères et Ostracodes » des mares temporaires « Dayas » de marocaine Thèse es-sciences. Univ, Provence Aix Marseille. 1, 217 p
- **Ramsdale, C.D. & Haas, E., 1978.** Some aspects of epidemiology of resurgent malaria in Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72: 570-580.
- **Ramsdale, C.D. & De Zulueta, J., 1983.** Anophelism in the Algerian Sahara and some implications of the construction of a trans-Sahara highway. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 86: 51-58.
- **Ramsdale C. & Snow K. 2000.** Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. *European Mosquito Bulletin*. 7: 1-26.
- **Rioux, J.A., 1955.** Contribution à l'étude systématique et écologique des culicidés du méditerranéen, Thèse de Médecine, Faculté de Médecine de Montpellier. Tome I et II.
- **Rioux, J.A., 1958.** Les culicidés du « midi » Méditerranéen. Encyclopédie entomologique. P. Lechevallier édit. 35 : 303pp.
- **Rioux, J.A. & Ruffié J., 1957.** Présence d'*Anopheles maculipennis s.sp. subalpinus* Hackett et Lewis, 1937 en Bas-Languedoc. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 50: 831-837.
- **Rioux, J.A., Ruffié J. & Pech J., 1959.** Évolution des idées en entomologie médicale. *Biologie Médicale Paris*. 48: 215-237.
- **Ristocelli, A., 1946.** Sur la présence à Marrakech d'*Anopheles hispaniola*. *Ann. Parasitol.* 21: 1-4.
- **Rishikesh, N., Dubitiski, A.M., Moreau, C.M., 1988.** Malaria vector control : biological control in Wernsdorfer WH Mc Gregor SI eds Malaria principals and practice of malariology Newyork Churchill Livingstone, 1227 -49
- **Robert, V., Awono-Ambene, H.P. & Thioulouse, J., 1998.** Ecology of larval mosquitoes, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culcidae) in market-garden Welles in urban Dakar, Senegal. *Journal of Medical Entomology*. 35: 948-955.
- **Rodhain, F & Perez, C., 1985.** Précis d'Entomologie Médicale et Vétérinaire. *Maloine*, Paris, 458 pp
- **Rodriguez, A.D, Rodriguez M.H, Meza, R.A, Hernandez, J.E, Rejmanek, E, Savage H.M, Roberts D.R, Pope K.O & Legters L., 1993.** Dynamics of population densities and vegetation associations of *Anopheles albimanus* larvae in a coastal area of southern Chiapas, Mexico. *Journal of American Mosquito Control Association*. 9: 46-58.

- **Romeo Viamonte, J.M., 1950.** Los anofelinos de Espana y de la zona espanola del Proectorado de Marruecos. *Revista de Sanidad e Higiene Publico.* 24: 213-295.
- **Romi, R., 1999.** *Anopheles labranchiae*, an important malaria vector in Italy, and other potential malaria vectors in Southern Europe. *European Mosquito Bulletin.* 4: 8-10.
- **Romi, R., Pontuale, G. & Sabatinelli, G., 1997.** Les zanzare italiene: generalità e identificazione degli stadi preimaginali (Diptera, Culicidae). *Fragmenta entomologica, Roma.* 29: 1-148.
- **Romi, R., Sabatinelli, G. & Majori, G., 2001.** Could malaria reappear in Italy? *Emerg. Infect. Dis.* 7: 915-919.
- **Romi, R., Boccolini D., Di Luca, M., La Rosa, G. & Marinucci, M., 2000.** Identification of the sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex by heteroduplex analysis. *Insect Molecular Biology.* 9: 509-513.
- **Romi, R., Boccolini, D., Hovanesyan, I., Grigoryan, G., Di Luca, M. & Sabatinelli, G., 2002.** *Anopheles sacharovi* (Diptera: Cu licidae): a re-emerging malaria ve ctor in the Ararat Valley of Armenia. *Journal of Medical En tomology.* 39: 446-450.
- **Romi, R., Pierdominici, G., Severini, C., Tamburro, A., Cocchi, M., Menichetti, D., Pili, E., Marchi, A., 1997.** Status of malaria vectors in Italy. *J Med Entomol.* 34: 263-271.
- **Ross, R., 1897.** On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *Brit. Med. J.* 18: 1786-1788.
- **Roubaud, E., 1934.** Un type racial nouveau de l'*Anopheles maculipennis*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.* 27: 737-740.
- **Roubaud, E., 1935.** Variété nouvelle de l'*Anopheles maculipennis* au Maroc. *A. maculipennis sicaulti*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.* 28: 107-111.
- **Roubaud, E. & Treillard, M., 1934.** Observation sur les moustiques de la Crau II. *l'Aedes (O) detritus* Haliday. *Bull .Soc., Pat., Exot.* 36 : 94-101.
- **Roubaud, E. & Treillard, M., 1936.** Sur une variété portugaise de l'*Anopheles maculipennis* (groupe *atroparvus*). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.* 29: 383-392.
- **Roubaud, E., Collas-Belcour, J. & Treillard, K., 1935.** Influence de la concentration en sel marin sur le developpement larvaire d'*Anopheles maculipennis* (var. *atroparvus*, *falax*, et *labranchiae*). *Bull Sot. Path. Exot.* 28 : 568- 571.
- **Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics.* 19: 2496-2497.
- **Ruiz, F., Linton, Y.M., Ponsonby, D.J., Conn, J.E., Herrera, M., Quinones, M.L., Velez, I.D., Wilkerson, R., 2010.** First record of *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey 1945 in Colombia confirmed by mtDNA COI barcodes and rDNA ITS2 sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105: 899-903.

-S-

- **Salieres, A., Guy, A., Suzzoni Blatger, J., Cousserans, J., 1978.** Synopsis of four years of research on the 'maculipennis complex' (Diptera – Culicidae – Anophelinae). *Ann Parasitol Hum Comp.* 53:751-756.
- **Sattler, M.A., Mtasiwa, D., Kiama, M., Premji, Z., Tanner, M., Killeen, G.F. & Lengeler, C., 2005.** Habitat characterization and spatial distribution of *Anopheles sp.* Mosquito larvae in Dar es-Salaam (Tanzania) during an extended dry period. *Malaria Journal.* 4:4.
- **Sautet, J. & Quilici, R., 1971.** A propos de quelques cas de paludisme autochtone contractés en France pendant l'été. *Presse Med.* 79 : 524.
- **Savage, H.M., Rejmankova, E., Arredondo-Jimenez, J.I., Roberts, D.R. & Rodriguez, M.H., 1990.** Limnological characterization of larval habitats for two primary malarial vectors, *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis*, in coastal areas of Chiapas State, Mexico. *Journal of American Mosquito Control Association.* 6: 612-620.
- **Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.P., Rhaïem, A., Brunhes, J., 2001.** The Mosquitoes of Europe (CD-Rom). Montpellier: IRD Éditions & EID Méditerranée; Première version (2001) mise à jour 2011.
- **Schaffner, F., 1998.** A revised checklist of French mosquitoes. *European Mosquito Bulletin.* 2: 1-9.
- **Sedaghat, M.M., Howard, T. & Harbach R. E., 2009.** Morphological study and description of *Anopheles (Anopheles) persiensis*, a member of the Maculipennis Group (Diptera: Culicidae: Anophelinae) in Iran, *Journal of Entomological Society of Iran.* 28 (2): 25-35
- **Sedaghat, M.M., Linton, Y.-M., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Harbach, R.E., 2003a.** The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. *Bull. Entomol. Res.* 93: 527-535.
- **Sedaghat, M.M., Linton, Y.M., Nicolescu, G., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Harbach, R.E., 2003b.** Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. *Syst. Entomol.* 28: 241–256.
- **Sedaghat, M.M., & Harbach, R. E., 2005.** An annotated checklist of the Anopheles mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Iran Mohammad Mehdi, *journal of Vector Ecology.* 30 (2): 272-276.
- **Séguy, E., 1930.** Contribution à l'étude des Diptères au Maroc. *Mem. Soc. Sci. Nat. Phys.* 24: 206.
- **Senevet, G. & Andarelli, G., 1956.** Les anophèles de l'Afrique du Nord et du Bassin Méditerranéen. Éditions Paul Lechevalier, Paris *Encycl. Ent.* 33 : 280 pp.
- **Senevet, G. & Andarelli, L., 1961.** Contribution à l'étude de la biologie des Anophèles algériens. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 39 : 393-400.
- **Sergent, E., 1937.** Oeufs d'*Anopheles maculipennis* de France et d'Algérie. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 15 : 214-216.

- **Sergent, E., 1939.** Sur l'oeuf de *maculipennis melanoon* Hackett du littoral algérois. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 17: 59–61.
- **Short, H.E. & Ghrnham, P.C.C., 1948.** The pre-erythrocytic development of *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium vivax*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene.* 44: 405-419
- **Sicault, G., Messerlin, A., Lumeau, J., Fritz, J., 1935.** Le paludisme dans le Gharb. *Bulletin de l'Institut d'Hygiène du Maroc.* 5: 5 - 91.
- **Sidjanski, S. & Vanderberg, J.P., 1997.** Delay migration of plasmodium sporozite from the mosquito bite site to blood, *American Journal of Tropical Medecine and Hygien.* 57 (4): 426-429
- **Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. 1994.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87 (6): 651-701.
- **Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Okara, R.M, Van Boeckel, T., Godfray, H.C. J., Harbach,H.E., Hay S.I., 2010.** The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis, *Parasites & Vectors.* 3:117.
- **Smyth, N.T., 1992.** The Polymerase Chain Reaction: History, Methods and Application. *Dia. Mol. Path.* 1: 85-172
- **Sonnier, Laure., 1999.** Techniques de biologie moleculaire (rapd-pcr, pcr allèle spécifique) appliquées à la caracterisation d'un vecteur du paludisme en Asie du sud-est, *Anopheles dirus*. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier. Stage Ingénieur. Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, IRD Montpellier, 95p
- **Somboon, P., Walton, C., Sharpe, R.G., Higa, Y., Tuno, N., Tsuda, Y., Takagi, M., 2001.** Evidence for a new sibling species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17: 98-113
- **Stegnii, V.N. & Kabanova, V.M., 1978.** Cytoecological study of indigenus populations of the malaria mosquito in the territory of the U.S.S.R. I. Identification of a new species of *Anopheles* in the *maculipennis* complex by the cytodiagnostic method. *Mosquito Systematics.* 10: 1-12.
- **Stephens, J.W.W. & Christophers, S.R., 1906.** Étude pratique du paludisme et des parasites du sang. Paris, Editions Octave Doin: 194.
- **Stone, A., Knight, K.L. & Starcke, H. 1959.** A Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera, Culicidae). Thomas Say Foundation, vol. 6. Washington D. C., *entomological Society of America.* 358 pp.
- **Sucharit, S. & Komalamisra N., 1997.** Differentiation of *Anopheles minimus* species complex by RAPD-PCR technique. *J. Med. Assoc. Thai.* 80: 598 - 602.

- **Sudia, W.D. & Chamberlain R.W., 1962.** Battery-operated light trap, an improved model. *Mosq. News.* 22: 126-9.

-T-

- **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- **Thiele, D., 1990.** The technique of Polymerase Chain Reaction- a New Diagnostic tool in Microbiology and other Scientific Fields (Review). *Zentralbl Bakteriol.* 273: 431-454
- **Trari, B., 1991.** Culicidées (Diptera) Catalogue raisonné des peuplements du Maroc et études typologiques de quelques gîtes du Gharb et leurs communautés larvaires culicidées (Diptera). Thèse de 3ème cycle, Université Mohamed V, Faculté des Sciences de Rabat. 203p
- **Trari, B., Harbache, R., Himmi, O., El Algabani, M.A., Daki & Agoumi, A., 2004.** An inventariay of mosquitoes of Morocco, Genus *Anopheles* (Diptera Culicidae). *Europ Mosqui Bull. Contro. Asso (EMCA).* 18: 1-19.

-U-

- **Ulrike Fillinger, Heleen Sombroek., Silas Majambere, Emiel van Loon, Willem Takken and Steven W Lindsay., 2009.** Identifying the most productive breeding sites for malaria mosquitoes in The Gambia, *Malaria Journal.* 8: 62
- **Utrio, P., 1979.** Geographic distribution of mosquitoes (Diptera, Culicidae) in eastern Fennoscandia. *Notulae Entomologicae.* 59: 105-123.

-V-

- **Van Bortel, W., Trung, H. D., Roelants, P., Harbach, R. E., Backeljau, T. & Coosemans, M., 2000.** Molecular identification of *Anopheles minimus s.l.* beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect Mol. Biol.* 9(3): 335-340
- **Van Thiel, P.H., 1927.** Sur l'origine des variations de taille de l'*Anopheles maculipennis* dans les Pays-Bas. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.* 20: 366-390.
- **Viegas, S.C., 1978.** Lutte contre le paludisme en Algérie. Méthodes et résultats actuels. Thèse Doctorat en Médecine. Université Claude-Bernard Lyon-I, n°509, 181p.

-W-

- **Ward, R.A., 1984.** Second supplement to "A catalog of the mosquitoes of the World" (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics.* 16: 227-270.
- **Ward, R.A., 1992.** Third supplement to "A catalog of the mosquitoes of the world" (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics* 24: 177-230.
- **Wernsdorfer, W.H. & Mcgregor, I.J., 1988.** *Malaria Principles and Practices of Malariology.* Churchill Livingstone ed. Vol 1 et 2, p1818.

- **White, G.B., 1978.** Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. *Mosquito Systematics*. 10: 13-43.
- **White, G.B., 1981.** Academic and applied aspects of mosquito cytogenetics, *Insect Cytogenetics*. Symposia of the Royal Entomological Society of London, London. Pp: 245-274,
- **World Health Organization (WHO), 1957.** Sixteenth report of the WHO Expert Committee on malaria WHO Technical Report Series n°123
- **World Health Organization (WHO), 1963.** Insecticide résistance and vector control. Thirteenth report of the who, Expert Committee on Insecticides WHO *Technical Report Séries* n°324
- **World Health Organization (WHO), 1975.** Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques. n°13. Geneva Switzerland.

-Z-

- **Zahar, A.R., 1990.** Vector bionomics in the epidemiology and control of malaria. Part II. The WHO European region and the WHO Eastern Mediterranean region. Volume II: Applied field studies. Section III: Vector bionomics, malaria epidemiology and control by geographical areas. (A): The Mediterranean Basin. WHO, 226p. Part II. World Health Organ. VBC/90.2, 190.
- **Zotta, G., 1938.** Contribution à l'étude de la distribution des races d'*Anopheles maculipennis* en rapport avec les grandes lignes de repartition du paludisme en Roumanie. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie*. 2: 209-246.
- **Zvantsov, A.B., Rozyev, K., Gordeev, M.I., Goriacheva, I.I., Khemzaev, K.H., Ezhov, M.N., 2010.** Detection of *Anopheles artemievi* Gordeev et al. (Diptera, Culicidae) in Turkmenistan. *Med Parazitol (Mosk)*. 3: 27-8.

# ANNEXES

## ANNEXE 1

### FICHE TECHNIQUE DU GITE LARVAIRE DANS LA PROVINCE DE LARACHE

Date ...../...../.....

#### 1. Localisation du gîte

Secteur..... Coordonnées géographique :.....

Localité..... Type de gîte :.....

Distance entre le gîte et l'habitat humain le plus proche :  < 100m

> 100m

#### 2. Caractéristiques du gîte

Origine :  Naturel  
 Artificiel

Nature :  Temporaire  
 Permanent

Profondeur (cm) :.....

#### 3. Paramètres physico-chimiques

Température de l'eau :

pH :

Conductivité :

Oxygène dissout :

Turbidité :

Salinité :

#### 4. Résultats des paramètres environnementaux

Algues filamenteuse :  Absente  
 Présente

Plantes émergents :  Absente  
 Présente

Nom de la plante :

#### 5. Résultats des pêches larvaires

Densité larvaire :

Espèces trouvées :

## ANNEXE 2

**Tableau des résultats bruts des différentes paramètres étudiés**

N° Station	Localité	Nom du gîte	TG	Pr	pH	Tr	Cd (µs/cm)	Od (mg/l)	Sa	T°	Paf	Ppe	Ph	Tp	Ter	Présence ou absence d'Anophèles	Densité anophèles	Densité <i>An. Labranthiae</i>	Densité <i>An. cinereus</i>
1	Boucharemn	Boucharemn	Rizière	25	6	54	1325	10,58	0,3	26	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	faible
2	Boucharemn	Boucharemn	Rizière	25	6	54	2020	9,12	0,3	26	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	faible
3	Boucharemn	Boucharemn	Rizière	25	7	54	732	7	0,3	26	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	faible
4	Boucharemn	Boucharemn	Daya	50	8	150	874	8,25	0,2	26	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
5	Boucharemn	Boucharemn	Daya	50	8	160	859	8,14	0,2	26	Non	Oui	Non	NA,	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
6	Boucharemn	Boucharemn	Daya	50	8	150	858	8,11	0,2	26	Non	Oui	Non	NA,	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
7	Oulad skhar	Oulad sekhar	Daya	150	6	106	1080	6,48	0,3	32	Oui	Oui	Oui	LG	AL	Positif	Faible	Faible	Faible
8	Aouamra D	Aouamra D	Daya	50	6	140	1138	6,83	0,3	27	Oui	Oui	Non	TD	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
9	Bargha	Bargha	Daya	130	8	150	990	8,9	0,8	30	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
10	Chkaifene	Chkaifene	Daya	50	7	116	877	8,36	0,2	27	Oui	Non	Oui	pas de plante	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
11	Chkaifene	Chkaifene	Daya	100	7	130	1063	10,1	0,3	27	Oui	Oui	Oui	TL	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
12	Diab	Diab	Daya	50	8	200	840	5,6	0,2	31	Non	Oui	Oui	TL	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
13	Diab	Diab	Daya	50	8	300	830	5,6	0,2	30	Non	Oui	Oui	TL	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
14	Ould ben sayad	Oued makhazine	Oued	100	6	140	840	7,2	0,2	26	Oui	Non	Non	pas de plante	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Elevé
15	Oulad mesbah	Dig makhazine	Daya	25	7	110	1417	8,9	0,3	26	Oui	Oui	Non	TD	Al	Positif	Elevé	Elevé	Faible
16	Oulad Sayar	Oued sayar	Oued	50	7	100	1203	7,22	0,4	27	Oui	Oui	Non	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Faible

N° Station	Localité	Nom du gîte	TG	Pr	pH	Tr	Cd (µs/cm)	Od (mg/l)	Sa	T°	Paf	Ppe	Ph	Tp	Ter	Présence ou absence d'Anophèles	Densité anophèles	Densité <i>An. Labranthiae</i>	Densité <i>An. cinereus</i>
17	Kharba	Oued kharba	Oued	50	7	100	632	3,79	0,1	28	Oui	Oui	Oui	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Elevé
18	Boujbel	Oued kabir	Oued	50	7	120	691	4,15	0,1	28	Oui	Oui	Non	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Elevé
19	Sidi ali	Oued Hrech	Oued	100	7	100	382	2,89	0,1	32	Oui	Oui	Oui	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Elevé
20	Tazmart		Daya	150	8	120	443	2,66	0,1	31	Non	Oui	Oui	TD	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
21	Ayacha	Oued Ayacha	Oued	40	6	130	853	5,12	0,2	29	Oui	Oui	Non	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Elevé	Faible
22	Doukala	Doukala	Daya	100	8	113	1357	8	0,2	29	Non	Oui	Non	NAO	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
23	Bdawa	Bdawa	Daya	80	8	255	985	4,7	0,1	30	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
24	Oulad ben sayad	makhazine	oued	100	8	200	1180	7,2	0,4	32	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
25	Oulad mesbah	Dig makhazine	Daya	25	6	110	620	3,72	0,1	33	Oui	Oui	Non	TD	Al	Positif	Elevé	Elevé	Faible
26	Bghada	Graa	Daya	150	8	100	267	1,61	0,1	31	Oui	Oui	Non	NA,	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
27	Bnanda	Oued cheikh	Oued	150	8	130	725	4,34	0,1	31	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
28	Naamine	Oued ouarour	Oued	150	7	140	936	5,62	0,2	31	Oui	Non	Non	pas de plante	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Elevé
29	Harara	Oued azla	Oued	150	8	145	570	3,42	0,2	36	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
30	Limitrophe	Oued loukous	Oued	150	6	136	1751	10,54	0,7	34	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
31	Fdane jbel	Oued touitat	Oued	70	6	130	1398	8,38	0,5	34	Oui	Oui	Non	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Faible
32	Limitrophe	Oued mansour	Oued	70	7	120	859	5,15	0,2	36	Oui	Oui	Non	NO	Al et AC	Positif	Elevé	Faible	Faible
33	Boucharen	Boucharen	Daya	100	8	160	745	4,47	0,1	27	Non	Oui	Oui	NA,	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
34	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	7	60	645	3,87	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
35	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	7	65	627	3,76	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
36	Diab	Diab	Daya	70	8	460	930	5,6	0,2	30	Non	Oui	Oui	TL	Absence d'espèce	Négatif	Faible	Faible	Faible

N° Station	Localité	Nom du gîte	TG	Pr	pH	Tr	Cd (µs/cm)	Od (mg/l)	Sa (g/l)	T°	Paf	Ppe	Ph	Tp	Ter	Présence ou absence d'Anophèles	Densité anophèles	Densité <i>An. Labranthiae</i>	Densité <i>An. cinereus</i>
37	Chkaifene	Chkaifene	Daya	100	8	170	888	5,33	0,2	27	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
38	Chliha	Chliha	Daya	150	8	160	1002	7,9	0,3	34	Non	Oui	Oui	LG	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
39	Chliha	Chliha	Daya	150	8	200	1002	7,9	0,3	34	Non	Non	Oui	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
40	Chliha	Chliha	Daya	150	8	120	993	5,91	0,3	34	Non	Non	Oui	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
41	Shishat	Chliha	Daya	150	8	125	968	5,74	0,3	28	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
42	Shishat	Chliha	Daya	150	8	130	817	4,9	0,2	29	Oui	Oui	Non	NA	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
43	Ain chouk	Ain chouk	Daya	150	8	110	1004	5,98	0,3	27	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
44	Ain chouk	Ain chouk	Daya	100	8	140	743	4,45	0,1	26	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
45	Ain chouk	Ain chouk	Daya	100	8	70	1480	8,9	0,8	30	Non	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible
46	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	6	70	645	3,87	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
47	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	6	70	627	3,76	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
48	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	6	70	645	3,87	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
49	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	6	70	627	3,76	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
50	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	6	70	645	3,87	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
51	Boucharen	Boucharen	Rizière	25	6	90	627	3,76	0,1	28	Non	Oui	Non	OS	AL	Positif	Elevé	Elevé	Faible
52	Begara	Begara	Daya	50	7	130	859	6,14	0,2	32	Oui	Oui	Non	TL	AL	Positif	Faible	Faible	Faible
53	Begara	Begara	Daya	50	7	170	857	5,14	0,2	33	Oui	Oui	Non	TL	AL	Positif	Faible	Faible	Faible
54	Khrachba	Oued lagham	Oued	170	8	170	1190	7,13	0,4	30	Oui	Non	Non	pas de plante	Absence des larves	Négatif	Faible	Faible	Faible

AL : *An. labranthiae*

AC : *An. cinereus*

Pr : profondeur

Tr : Turbidité

Cd : conductivité

Od : Oxygène dissous

Sa : salinité

T° : température

Ps : présence des algues filamenteux  
TD : *Typha domingensis*

Tp : Type de plante

Ppe : présence des plantes émergentes

Ter : type d'espèces récoltées

NO : *Nerium oleander*

TL : *Typha latifolia*

NAO : *Nasturtium officinalis*

LG : *Lemna gibba*

### ANNEXE 3 :

**Tableau des résultats brut de l'élevage de *Anopheles labranchiae* à l'insectarium**

Paramètres	Nombre d'œufs récoltés (NOR)	Nombre d'œufs écloses (NOE)	Nombre des larves de stades 4 (NLS4)	Nombre des nymphes obtenus (NNO)	Nombre d'Anophèles (NA)	Nombre des nymphes non éclos (NNNE)	Nombre d'adultes Femelles (NF)	Nombre d'adultes Mâles (NM)	Te (%)	Tsl (%)	Tn (%)	Tem (%)	Tiem (%)	Rpi (%)	Rg (%)
Lots															
Lot 1	200	150	88	83	27	56	20	7	75	59	94	33	67	55	14
Lot2	300	218	140	56	44	12	30	14	73	64	40	79	21	26	15
Lot 3	280	200	150	17	10	7	6	4	71	75	11	59	41	9	4
Lot4	700	330	120	83	29	54	18	11	47	36	69	35	65	25	4
Lot5	700	680	280	144	59	85	39	20	97	41	51	41	59	21	8
Lot 6	150	114	79	28	13	15	10	3	76	69	35	46	54	25	9
Lot7	500	256	150	31	27	4	16	11	51	59	21	87	13	12	5
<b>Total</b>	2830	1948	1007	442	209	233	139	70	491	403	322	379	321	173	58
<b>Moyenne</b>	404	278	144	63	30	33	20	10	70	58	46	54	46	25	8

**Tn** : Taux de nymphose

**Te** : Taux d'éclosion

**Tsl** : Taux de survie larvaire

**Tem** : Taux d'émergence

**Tiem** : Taux d'inhibition de l'émergence

**Rpi** : Rendement pré-imaginal

**Rg** : Rendement global



DOCTORAT  
Résumé de la Thèse

**Discipline :** Biologie

**Spécialité :** Parasitologie et Entomologie Médical

**UFR :** Biodiversité et aquaculture (SV01/01)

**Responsable de l'UFR :** Pr YAHYAOUI Ahmed

---

**Titre de la thèse :** Etude d'*Anopheles labranchiae* (Diptera, Culicidae), vecteur du paludisme, au nord du Maroc: Caractérisation moléculaire et approche écologique

---

**Prénom, Nom :** laboudi Majda

**Résumé :**

Les anophèles sont les seuls vecteurs connus du paludisme. Au Maroc, cette infection constituait un réel problème de santé publique. Aujourd'hui, bien que la maladie ait été éliminée, la région Nord est constituée de véritables gîtes actifs pour le complexe *Anopheles maculipennis*. Il regroupe 12 espèces jumelles, que l'on ne peut différencier qu'à l'aide de la biologie moléculaire.

En effet, les travaux menés sur le groupe *Anopheles maculipennis* restent fragmentaires et limités à certaines zones. Afin d'améliorer et d'actualiser les connaissances sur la composition de ce complexe et de son écologie, nous avons mené une série d'échantillonnage, dans différents biotopes et gîtes larvaires dans le nord ouest du Maroc. Les résultats de l'identification d'espèce, par PCR multiplexe, menée sur 407 anophèles du complexe *maculipennis* confirment la présence de la seule espèce *An. labranchiae* représentant le complexe. Par ailleurs, le séquençage de l'ADN mitochondriale de 89 spécimens d'*An. labranchiae*, réalisé pour la première fois au Maroc, a été comparé à celui des populations de l'Algérie ; les résultats prouvent la présence des mêmes caractères génétiques au sein des deux pays. Aucune différence génétique n'a été détectée entre les populations récoltées.

En parallèle, nous avons effectué une étude transversale dans 25 localités de la province de Larache. 52% des 54 habitats aquatiques investis se sont avérés être des gîtes productifs de larves d'anophèles. *An. labranchiae* étant l'espèce prédominante avec une fréquence de 76 %. L'analyse statistique a montré que les facteurs influençant l'abondance des larves d'*An. labranchiae* sont la turbidité, la profondeur, le pH du milieu et la présence des rizières.

D'un autre côté, l'élevage d'*An. labranchiae* en insectarium a permis de déterminer les paramètres biologiques de la première génération: 70 % pour le taux d'éclosion, 54 % pour le taux d'émergence, 46 % pour le taux de nymphose, 25 % pour le rendement pré-imaginal et 46 % pour le taux d'inhibition de l'émergence. Le sex-ratio de la première génération est de 0,50. Bien qu'il soit difficile d'entretenir cet anophèle marocain, l'obtention de la 1<sup>ère</sup> génération F1 ne peut être que prometteur pour continuer nos expériences dans cet axe étude. Les résultats de ce travail constituent une base de données intéressante pour prévoir une lutte antivectorielle très efficace.

---

**Mots-clefs (5) :** Paludisme, le complexe *Anopheles maculipennis*, PCR multiplex, séquençage d'ADN mitochondrial, écologie d'*An. labranchiae*, élevage d'*An. labranchiae*.