

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2014-2015

N°d'ordre : 145



THÈSE

Spécialité : Entomologie

Présentée à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar pour

obtenir le diplôme de **DOCTORAT** :

par :

Raymond Demba NDIONE

**CONTRÔLE DU MOUSTIQUE *CULEX*
QUINQUEFASCIATUS PAR LE SUNEEM 1%
(*AZADIRACHTA INDICA*, A. Juss): ÉTUDES DE LA
RÉSISTANCE ET DE L'HISTOPATHOLOGIE**

Soutenu le Samedi 20 Juin 2015 à la Faculté des Sciences et Techniques devant le jury :

Président : Professeur Omar Thiom THIAW (UCAD, FST, Dakar)

Rapporteurs : Professeur Ngor FAYE (UCAD, FST, Dakar)
Professeur Malick DIOUF (UCAD, FST, Dakar)
Professeur Ioan MOGLAN (UAIC, FB, Roumanie)

Examineur Professeur Ousmane FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Directeur De Thèse Professeur Mady NDIAYE (UCAD, FST, Dakar)

Titre : Contrôle du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) par un biopesticide le Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. juss): études de la résistance et de l'histopathologie.

Nom du Candidat : Raymond Demba NDIONE

Nature du mémoire : Thèse de Doctorat Unique de Biologie Animale, spécialité : Entomologie

Président : Professeur Omar Thiom THIAW (UCAD, FST, Dakar)

Rapporteurs : Professeur Ousmane FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Professeur Ngor FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Professeur Ioan MOGLAN (UAIC, FB, Roumanie)

Directeur De Thèse : Professeur Mady NDIAYE (UCAD, FST, Dakar)

Examineur : Professeur Malick DIOUF (UCAD, FST, Dakar)

RESUME

Culex quinquefasciatus constitue un véritable problème de santé publique de par les maladies qu'il transmet mais surtout de par leur nuisance (piqûre, bourdonnement). La stratégie de contrôle du vecteur (*Culex quinquefasciatus*) par le Suneem 1% est un bon moyen pour lutter efficacement contre ces maladies. C'est dans ce contexte que s'est inscrite cette thèse qui a pour objectif la lutte contre *C. quinquefasciatus* par l'utilisation du Suneem. Pour atteindre ce but, 3500 œufs de *C. quinquefasciatus* correspondant à plusieurs barquettes (une barquette de 300 œufs immergée dans 20 ml d'eau distillée dans chaque boîte de pétri) ont été traités avec différents volumes de Suneem 1% (0,01 ml, 0,02 ml, 0,03 ml, 0,04 ml, 0,05 ml, 0,06 ml) et une boîte de témoin (20 ml d'eau distillée). Aussi, 3000 larves toutes stades confondus de *C. quinquefasciatus* ont été traitées avec des concentrations du Suneem 1% (2mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l ; 10 mg/l ; 12 mg/l ; 14 mg/l ; 16 mg/l, 18 mg/l à 20 mg/l). Les larves mortes après quelques heures de traitement sont traitées par la technique de la microscopie électronique. Les larves résistances (après 5 générations) et celles témoins sont fixées puis analysées par pcr pour déterminer des gènes de résistance. Les œufs de *C. quinquefasciatus* ont éclos à 82% pour $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l et pour 30% à $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 24 heures). Par la suite, nous avons enregistré un taux d'éclosion des œufs de 81% pour $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 48 heures). Un taux d'éclosion à 50% a été obtenu dans la gamme de concentrations entre $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 48 heures). La concentration de $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l a entraîné un faible taux d'éclosion de 2%. Les œufs ont éclos à 98% à $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine (après 72 heures). Un taux d'éclosion à 50% a été obtenu dans la gamme de concentrations entre $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 72 heures). La concentration à $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l a donné un faible taux d'éclosion de 0,40%. Par contre, les larves de stades jeunes (stades 1 et 2) de *C. quinquefasciatus* ont subi une mortalité de 50% à 12 mg/l d'azadirachtine (CL50 après 24 heures) et entre 8 et 10 mg/l (après 48 heures). La CL90 a été obtenue à 18 mg/l après 24 heures de traitement avec le Suneem 1% et à 14 mg/l (après 48 heures). Les CL50 et CL90 n'ont pas été obtenue avec le traitement des stades âgés (stades 3 et 4) de *C. quinquefasciatus* avec le Suneem 1%. Les concentrations 14 et 20 mg/l ont entraîné 48% de mortalité (environ 50%) de *C. quinquefasciatus* (après 48 heures). Les coupes histologiques des larves mortes ont montré des cellules épithéliales intestinales hypertrophiées, des excroissances au niveau apical. Les cellules sont désorganisées donnant un épithélium rompu. Enfin, on observe des nécroses cellulaires Le tissu musculaire et la cuticule sont aussi détruits. Par ailleurs, les moustiques qui ont résisté aux traitements après 5 générations ont montré par électrophorèse une amplification du gène kdr voltage-dépendant des populations naturelles de *C. quinquefasciatus* génération zéro (DSenCq G0) à 1000 pb, des populations traitées et mortes après 24 heures génération 1 (DSenCqG1) à 1000 pb et des populations insensibles voire « résistantes » au Suneem après cinq générations G5 (DSenCqG5) à 1200 pb. L'analyse des séquences du gène kdr des moustiques témoins et traités a montré des différences dans les bases au niveau des positions 1 à 17, 569 à 582, et 602 à 605. Après la position 1090, la séquences du gène kdr des moustiques traités est la plus longue. Tous ces résultats, nous permettent de dire que le Suneem 1% (biopesticide local) est efficace dans la lutte contre les moustiques et dans la prévention des maladies vectorielles. Seulement son utilisation doit se faire de manière ponctuelle pour éviter les pressions de sélection qui sont souvent à l'origine du développement de certains gènes responsables de la résistance.

Mots-clés : Suneem 1% (*Azadirachta indica*), *Culex quinquefasciatus*, traitement, dose létales 50 et 90 (DL₅₀ et DL₉₀), toxique, sensibilité, nécroses cellulaires, résistance, gène kdr.

Title: Control of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) by the biopesticide Suneem 1% (*Azadirachta indica* A. juss): resistance and histopathology effects studies.

Président : Professor Omar Thiom THIAW (UCAD, FST, Dakar)

Rapporteurs : Professor Ousmane FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Professor Ngor FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Professor Ioan MOGLAN (UAIC, FB, Roumanie)

Thesis supervisor : Professor Mady NDIAYE (UCAD, FST, Dakar)

Examiner : Professor Malick DIOUF (UCAD, FST, Dakar)

ABSTRACT

Culex quinquefasciatus mosquito's represent a real public health problems by diseases and nuisance (sting, buzz) that it transmit. Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss) could be a good way to fight effectively against *Culex quinquefasciatus* and the diseases transmitted. That is in real context, the study choice to fight *Culex quinquefasciatus* with Suneem 1%. To achieve this, about 3500 eggs of *Culex quinquefasciatus* were treated with different volumes of Suneem 1%: 0.01 ml; 0.02 ml; 0.03 ml; 0.04 ml; 0.05 ml to 0.06 ml. Subsequently, 3000 instars larvae (instars 1, 2, 3 and 4) of *Culex quinquefasciatus* were treated with Suneem with concentrations: 2 mg/l; 4 mg/l; 6 mg/l; 8 mg/l; 10 mg/l; 12 mg/l; 14 mg/l; 16 mg/l; 18 mg/l and 20 mg/l). The larvae died after a few hours of treatment are treated by the routine technique of electron microscopy. Larvae resistance to these treatments are fixed after five generations then analyzed by PCR to identify potential resistance genes. *Culex quinquefasciatus* eggs are hatched at 82 % to $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l and 30% to $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l (after 24 hours). Subsequently, we recorded a hatching rate of 81% to $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l (after 48 hours). A hatch rate of 50% was obtained at concentrations between 10^{-3} mg/l and $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l (after 48 hours). Concentration of $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l induced a low hatching rate of 2%. The eggs were hatched at 98 % to $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l azadirachtin (after 72 hours). A hatch rate of 50% was obtained in the concentration range between $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l and $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l (after 72 hours). The concentration $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l have given a low hatching rate of 0.40%. Concerning young instars larvae (instars 1 and 2) of *Culex quinquefasciatus* lead mortality at 12 mg/l azadirachtin (LC50 after 24 hours) and between 8 and 10 mg/l (LC 50 after 48 hours). The LC 90 was obtained at 18 mg/l (after 24 hours) and at 14 mg/l (after 48 hours). LC 50 and LC 90 are not obtained when older instars larvae (instars 3 and 4) of *Culex quinquefasciatus* are treated with Suneem 1%. Concentrations of 14 to 20 mg/l occurred 48% mortality of *Culex quinquefasciatus* (after 48 hours). Histological sections of dead larvae showed intestinal epithelial cell hypertrophy, protuberance in apical level. The cells are disrupted giving a ruptured epithelium. Finally, cell necrosis was observed. Muscle tissue and cuticle are also destroyed. In addition, for mosquitoes that have resisted of treatment after five generations, electrophoresis showed an amplification of the kdr gene voltage-dependent of natural populations of *Culex quinquefasciatus* generation zero (G0DSenCq) at 1000 bp, populations of *Culex quinquefasciatus* treated and died after 24 hours generation 1 (D1SenCqG1) at 1000 bp and insensitive or "resistant" populations to Suneem after five generations G5 (D5SenCqG5) to 1200 bp. Sequence analysis of kdr gene control and treated mosquito showed differences in the bases at the positions 1 to 17, 569 to 582, and 602 to 605. After position of 1090, the kdr gene sequences of treated mosquito are the longest. All these results allow us to say that Suneem 1% is effective in the fight against mosquitoes and in the prevention of vector-borne diseases. But to have best efficacy, you must to use Suneem timely to avoid selection pressures that are often the cause of the development of certain genes responsible for resistance.

Keywords: Suneem 1% (*Azadirachta indica*), *Culex quinquefasciatus*, treatment, lethal dose 50 and 90 (LD 50 and LD 90), toxic, sensitivity, cellular necrosis, resistance, kdr gene.

IN MEMORIAM

Je dédie ce travail :

À mes défunts parents :

- Papa Jacques Aly Ndione
- Maman Madeleine Ndiémé Ndione

Par Vous, j'ai obtenu la vie qui est un don de DIEU. Je rends grâce AU TOUT PUISSANT. Vous m'avez entretenu, éduqué et inculqué les vraies valeurs. Soyez en remerciés. Je prie DIEU LE TOUT-PUISSANT pour qu'IL vous accorde le repos éternel de vos âmes au PARADIS. Ameen !!!

À ma défunte nièce :

- Marie Noël Goufi Ndione. Tu as été arrachée à notre affection à très jeune âge alors que tu venais juste de célébrer tes premières communions. Que les ANGES te portent auprès de notre SEIGNEUR et que tu pries pour nous.

À mon défunt frère :

- Rigobert Ndione,
- À tous les défunts de la grande famille Ndione.

À nos défunts enseignants :

- de la Faculté des Sciences et Techniques qui nous ont quittés, en particulier notre regretté cher **Professeur Danamou Mounport**, éminent Professeur en Biologie Animale et spécialiste en Nématologie phytoparasite.

Vous avez été très tôt arrachés à notre affection. Puisse DIEU le TOUT-PUISSANT pour qui vous avez consacré toute votre vie sur terre vous accueille dans son PARADIS. Je vous témoigne toute mon affection et prie pour le repos de votre âme au PARADIS.

DEDICACES

- À mon frère Mathieu NDIONE et à toute sa famille (Mme Pauline Coura Faye Ndione, Jacques Aly Ndione, Cyprien Ganouth Ndione, Claude Déthié Ndione, Madeleine Ndiémé Ndione, Xavier Gana Ndione, Angélique Diouma Ndione, Céline Nogoye Ndione).
- À mon frère Fidèle Ndione et à toute sa famille (Mme Marie Josephine Mbaye Ndione, Hyacinthe Latyr Ndione, Hélène Ndiémé Ndione, Gabriel Sakagne Ndione, Julie Christine Ndione, Marietta Ndione, Aloyse Déglou Ndione, Etienne Ndione).
- À mon frère Alexis Ndione et à toute sa famille (Mme Marie Thérèse Faye Ndione, Josianne Ngoné Ndione, nathalie Ndione, Jacques Bernard Ndione).
- À mon frère Jean Pierre Boucar Ndione et à sa famille (Angélique Anna Ndione, Benoît Demba NDIONE).
- À mon beau frère M. Alfred Mbaye, ma sœur Mme Elisabeth Rama Ndione Mbaye et à toute sa famille (Ange Pascaline Ndella Mbaye, Toussaint Mbaye, Evarist Mbaye).
- À mes sœurs Mmes Angélique NDIONE et Claire NDIONE

Le temps est venu pour moi de vous rendre hommage et de vous témoigner mon immense affection et ma profonde gratitude. Nous devons continuer à œuvrer à fonder une famille unie et solidaire. Vous êtes tous pour moi un exemple de patience, de tolérance et d'abnégation pour le bien être de tous. Puisse ce travail vous comblez de joie et vous inciter à aller de l'avant et à faire plus et mieux.

- À tous mes enseignants de l'Elémentaire, du secondaire et surtout du Supérieur particulièrement ceux intervenant aux travaux pratiques et dirigés de la LIBCGS Pr Mady Ndiaye, Pr Paul Ngor Faye, Dr Lansana Konaté, Dr Cheikhna Diébakhaté, Dr Malick Diouf, ainsi que mes collègues enseignant-vacataires.

- À tous mes collègues, mention spéciale aux Docteurs Fawrou Sèye, Mamour Touré, Peinda Ogo Ly Soumaré, au doctorant M. Thierno Saidou Badiane et aux autres collègues du Département Dr Anne Marie Ndiaye Sarr, Dr Mamecor Faye, Dr Aminata Sène Samb ; Dr Malick Ndiaye (Département de Biologie végétale) ; mention spéciale à la comptable de la Licence Professionnelle en production Animale Mme Fatou Babou NIANG.

- A tous mes étudiants de la Licence Professionnelle en Production Animale (LPA) de l'année 2012-2013, 2013-2014 et 2014-2015 et aussi à ceux de la L1BCGS (Licence 1 Biologie Cellulaire et Géosciences).

Je vous dis un grand MERCI pour les bons moments passés ensemble pendant le travail et les moments de pause mais surtout pour les conseils.

- Mention spécial à ma femme Rose ngoné Diop Ndione qui a accepté de partagé les moments de joies mais aussi des moments de difficultés qui ne manquent pas dans la vie d'un chercheur, à sa Maman Sebille Thiaw, à Mme Rita Diop Mbaye, à Mlle Ephigénie Ndella Diop, à Mme Anette Diop et à ses frères en particulier Raymond Diop;

- Je remercie aussi mes ami(e) Honorine Ndione, Pierre Ndione, Antoinette Tine Ndione, Yvonne Ndione, Félix Ndione, Madeleine Faye, Henriette tine, Didier Tine, Mathias Diédhiou, Alphonse Tine, Simon Mbar Ndione, Wenceslas Ndione, Jean Claude Ndione.

Mon affection à votre égard ne saurait se traduire par des mots. Aussi l'affection que vous me témoignez ne me laisse pas indifférente. Votre soutien et vos encouragements ont toujours été constants. Puisse ce travail vous inspirer et vous inciter à aller plus loin. Profonde gratitude.

AVANT-PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire a été en grande partie réalisé au **Laboratoire de Biologie de la Reproduction (LBR)**, au sein de l'Unité d'Entomologie, de Rickettsiologie, de Bactériologie et de Virologie (UERBV) du Département de Biologie Animale (DBA) de la Faculté des Sciences et Techniques (FST) de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) dirigé par l'éminent Professeur Mady NDIAYE. Il a aussi été réalisé en étroite collaboration avec le **Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de la Faculté de Biologie de l'Université Alexandru Ioan Cuza de Iasi (Roumanie)** dirigé par les éminents Professeurs Ioan Moglan, Lucian Fusu, et Lucian Gorgan.

Je tiens à exprimer ma très forte gratitude à notre maître **Le Professeur Mady NDIAYE**, éminent Professeur titulaire des Universités et non moins enseignant-chercheur en Biologie Cellulaire, histologie, embryologie et génétique à la Faculté des Sciences et techniques et chef du Laboratoire de Biologie de la Reproduction. Je vous remercie surtout pour avoir accepté de diriger la réalisation de ce travail malgré vos multiples charges mais aussi pour la confiance que vous avez toujours placée en ma personne pour coordonner la Licence Professionnelle en Productions Animales (LPA) depuis le début jusqu'à nos jours. Que le Bon DIEU vous accorde une longue vie et une santé de fer. Je formule ces vœux et prières pour Mme NDIAYE (votre épouse) et aussi pour vos enfants.

Au **Professeur Omar Thiom THIAW**, enseignant-chercheur et ex-Directeur de l'Institut Universitaire de Pêche et d'Aquaculture (IUPA) pour avoir bien voulu présider mon jury de thèse malgré vos charges multiples. Je vous exprime ma profonde gratitude. Je ne saurais oublier le cours magistral de Biologie cellulaire que vous nous donniez avec dévouement et abnégation. Ce cours a été un socle pour notre culture scientifique. Merci Professeur pour tout et surtout bon rétablissement à vous. Que le Bon DIEU vous donne une longue vie, surtout une bonne santé. Ces vœux s'adressent aussi à Mme THIAW (votre épouse) et à vos enfants.

J'adresse mes sincères remerciements à notre maître **le Professeur Ousmane FAYE**, Eminent Professeur titulaire des universités, ex-Directeur de la formation doctorale Entomologie à l'École doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement et responsable du Laboratoire d'Ecologie vectorielle, pour avoir accepté malgré vos nombreuses charges d'être membre de notre jury de Thèse. Merci pour nous avoir si bien managé dans notre formation avec les intéressants cours spécifiques sur le contrôle des vecteurs et les phénomènes de

résistance. Ces cours m'ont beaucoup apporté dans la réalisation de ma thèse. Longue vie et santé à vous et aux membres de votre famille.

J'exprime ma profonde gratitude à mon maître **le Professeur Paul Ngor FAYE**, éminent Professeur titulaire de Biologie (Zoologie) et par ailleurs **Chef du Département de Biologie Animale**. Merci cher Professeur d'avoir bien voulu accepter d'être **rapporteur** de ma thèse et aussi d'être membre du jury malgré vos charges multiples. Merci aussi pour la lecture et les critiques objectives qui m'ont permis d'améliorer la qualité scientifique de ce travail. Merci aussi d'avoir bien voulu participer au jury. Vos critiques et suggestions pendant la soutenance permettront sans nul doute d'améliorer la valeur scientifique de ce travail mais aussi d'augmenter ma culture scientifique.

Je suis également très reconnaissant à notre maître **le Professeur Malick DIOUF, Maître de Conférences** et Directeur de l'Institut Universitaire de Pêche et d'Aquaculture (IUPA). Merci pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être **un des rapporteurs**. Vos critiques et suggestions permettront de rehausser la portée scientifique de ce travail. Longue vie et santé à vous et aussi aux membres de votre famille.

Je suis profondément reconnaissant au **Professeur Ioan MOGLAN**, Professeur titulaire de Biologie Animale et Ex-Doyen de la Faculté de Biologie de l'Université Alexandru Ioan Cuza de Iasi (Roumanie). Professeur, trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant mon projet de recherche pour un stage que j'ai effectué en votre sein et aussi pour m'avoir chaleureusement accueilli et fait découvrir votre si beau pays la Roumanie avec son peuple charmant. Merci pour avoir bien voulu apporter une correction scientifique à ce document et d'en être **un des rapporteurs**.

Je suis très reconnaissant aux Professeurs **Lucian Gorgan, Lucian Fusu** et **Madame Irina Gostin**, responsables des laboratoires de Biochimie et Biologie moléculaire, d'Histologie et de Microscopie électronique avec qui une collaboration fructueuse s'est engagée et qui m'a permis de traiter les échantillons de *Culex* (moustique) en PCR et en Microscopie électronique. Cette collaboration a été déterminante dans la réalisation de ma thèse.

Mes remerciements vont aussi au **Professeur Henri Luchian** vice-recteur chargé des relations internationales de l'Université Alexandru Ioan Cuza de Iasi (Roumanie) et à travers lui, Mme **Ionela Ciobanasu** responsable des bourses d'études à l'étranger (Eugene Ionesco, Auf, Cnbss, Mellon Fellowships) pour avoir diligenté mes dossiers auprès de la Faculté de Biologie de

l'UAIC et pour avoir répondu à nos préoccupations d'hébergement, de restauration en Roumanie. Que le Bon Dieu vous procure longue vie, santé et un rayonnement de votre institution.

Je ne saurais oublier les Directeurs des bureaux des agences universitaires de la Francophonie de l'Europe de l'Est et de l'Afrique de l'Ouest, à travers eux **Mmes Georgiana Rusu, Dana Georgescu** (coordonnatrices du bureau au de l'Europe de l'est) et **Fabar Sané** (coordonnatrice du bureau au de l'Afrique de l'ouest). Merci de nous avoir mis dans de bonnes conditions (départ, arrivée et séjour) pendant le stage de recherche. Merci aussi pour le séminaire de formation aux outils pour la publication en ligne.

Que tous ceux qui ont collaboré avec dévouement à la réalisation de ce mémoire trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Messieurs les **Docteurs Fawrou Sèye, Mamour Touré, Babacar NGOM, Khadijatou DIENG, Peinda Ly Soumaré**, mes collègues de laboratoire qui m'ont encouragé et qui ont participé à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent en ces mots l'expression de ma profonde gratitude.

Je réserve une mention toute particulière à l'ensemble du personnel technique du Département de Biologie Animale qui a permis en partie la réalisation de ce travail : **D. NGOM, D. DIOUF, M. MBENGUE, E. COLY, E. COLY, M. NDAO, M. SARR, I. DIOUF**.

Je tiens à remercier **Mme Rockhaya SENGHOR DIOUF**, secrétaire du Département de Biologie Animale et **Mme Fama DIOP** secrétaire de l'Ecole Doctorale SEV pour les nombreux et petits services rendus dans le cadre de ce travail.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Coupe schématique de la membrane plasmique avec le canal sodium-potassium (pompe Na^+/K^+ -ATPase voltage-dépendant) dans ses différentes activités.....32
- Figure 2 :** Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,1ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°1.....43
- Figure 3 :** Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,2ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°2.....43
- Figure 4 :** Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,3ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°3.....43
- Figure 5 :** Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,4ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°4.....43
- Figure 6 :** Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,5ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°5.....43
- Figure 7 :** Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,6ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°6.....43
- Figure 8 :** Immersion d'une barquette de *Culex quinquefasciatus* dans de l'eau distillée.....44
- Figure 9:** Traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* avec des concentrations croissantes de Suneem 1% dans des bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm (**série 1 à 6**).....45
- Figure 10:** Traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* avec des concentrations croissantes de Suneem 1% dans des bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm (**série 7 à 10**). Le douzième bocal constitue le témoin où les larves ne sont pas traitées et sont immergées dans de l'eau.....45
- Figures 11a et 11b:** Conditionnement des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées dans des cages de 30 cm² pour éviter toutes influences extérieures.....45

Figure 12: fixation larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> dans du glutaraldéhyde 2,5%.....	59
Figures 13 A et 13 B: Echantillons des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitées au Suneem dans des blocs d'épon pour la coupe en microscopie électronique à transmission (MET).....	60
Figure 14 : Echantillons des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> non traitées (témoins) réalisés pour la coupe en MET à l'Université Alexandru Ioan Cuza de Iasi en Roumanie.....	60
Figure 15: Coupe longitudinale du caecum gastrique d'une larve témoin de <i>C. quinquefasciatus</i> (non traitée au Suneem 1%).....	62
Figure 16: Coupe longitudinale au niveau de l'intestin moyen d'une larve témoin de <i>C. quinquefasciatus</i> (non traitée au Suneem 1%).....	62
Figure 17: Coupe longitudinale de l'intestin antérieur d'une larve de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitée avec le Suneem 1%.....	64
Figure 18: Coupe longitudinale de l'intestin postérieur d'une larve de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitée avec le Suneem 1%.....	64
Figure 19: Coupe longitudinale de l'intestin postérieur d'une larve de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitée avec le Suneem 1%.....	64
Figure 20: Utrastructure d'une portion d'une cellule épithéliale de l'intestin moyen d'une larve de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> témoin (larve non traitée avec le Suneem 1%).....	67
Figure 21: Utrastructure d'une partie de la cuticule d'une larve de <i>Culex quinquefasciatus</i> témoin (non traitée avec le Suneem 1%).....	67
Figure 22: Utrastructure d'une coupe d'une larve témoin de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> (larve non traitée avec le Suneem 1%) passant au niveau du tissu musculaire. Cette photo montre un tissu musculaire normal.....	69
Figure 23: Utrastructure d'une coupe d'une larve témoin de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> (larve non traitée avec le Suneem 1%) passant surtout au niveau de la cuticule.....	69
Figure 24: Utrastructure de cellules épithéliales de l'intestin moyen d'une larve de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitée avec le Suneem 1%. On note une intense nécrose cellulaire.....	71
Figure 25: Utrastructure d'une coupe d'une larve de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitée au Suneem 1% et passant au niveau de la cuticule. La cuticule est désorganisée.....	71

Figure 26: Ultrastructure d'une coupe d'une larve de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitée avec le Suneem 1% et passant au niveau du tissu musculaire. Les fibres musculaires sont rompues.....	71
Figure 27: Ultrastructure d'une coupe de <i>Culex quinquefasciatus</i> passant au niveau de l'intestin moyen.....	73
Figure 28: Ultrastructure d'une coupe de <i>Culex quinquefasciatus</i> passant au niveau de l'intestin moyen montrant des cellules nécrosées.....	73
Figure 29 : Photo d'une larve de stade 4 de <i>Culex quinquefasciatus</i>	81
Figure 30 : des larves traitées et mortes (DSenCq ^{G1}).....	81
Figure 31 : des larves qui ont survécues aux différents traitements (DSenCq ^{G5}).....	81
Figure 32 : des larves témoins ou larves non traitées ou populations souches naturelles (DsenCq ^{G0}).....	81
Figure 33: Les feuilles du neem <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	84
Figure 34 : Les fruits verts du neem <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	84
Figure 35 : Les amandes sèches du neem <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	84
Figure 36: L'huile de neem (Suneem 1%) extrait de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	84
Figure 37: Suneem 1% EC dans les contenants <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (neem).....	84
Figure 38 A et B : induction de la résistance par traitement des larves de stade 3 de <i>Culex quinquefasciatus</i> avec des concentrations croissantes en Suneem 1%.....	87
Figure 39 A et B : Adultes de moustique <i>Culex quinquefasciatus</i> émergés de larves qui ont survécues au traitement par le Suneem 1%. Ces adultes vont subir un gorgement et vont des œufs à partir desquels une nouvelle génération sera obtenue.....	87
Figure 40 : Quelques adultes de moustique émergés et fixés dans de l'éthanol à partir de larves survivantes au 1 ^{ier} traitement.....	40
Figure 41 : Placement des échantillons dans les tubes eppendorf avec la solution tampon TRIS EDTA.....	93
Figure 42 : Ajout d'un volume de phénol-chloroforme-isoamylique dans les tubes.....	93
Figure 43 : Centrifugation du mélange à 2000 Tours/minutes pour séparer les phases.....	93

Figure 44 : Dosage de la quantité d'ADN.....	93
Figure 45 : Préparation du gel d'Agarose.....	95
Figure 46 : Solution d'agarose bien dissoute dans le tampon.....	95
Figure 47 : Coulage du gel et placement des peignes.....	95
Figure 48 : Enlèvement des peignes.....	95
Figure 49 : Chargement de l'ADN standard dans le premier puits et les échantillons d'ADN dans les puits restants.....	95
Figure 50 : Placement du couvercle et branchement du dispositif.....	95
Figure 51 : Dispositif de l'électrophorèse en marche.....	95
Figure 52 : Concentration de l'ADN extrait par la méthode du DNA IQ des 3 types d'échantillons du moustique <i>Culex quinquefasciatus</i>	98
Figure 53 : Concentration de l'ADN extrait par la méthode du Phénol-chloroform des 3 types d'échantillons du moustique <i>Culex quinquefasciatus</i> (ng/μl).....	99
Figure 54 : Concentrations des amplicons (gènes amplifiés) de deux types d'échantillons de <i>Culex quinquefasciatus</i> (ng/μl).....	100
Figure 55 : amplicons du gène kdr des 3 échantillons de <i>Culex quinquefasciatus</i> relévés par électrophorèse sur gel d'Agarose (Promega®).....	100
Figure 56 : amplicons du gène kdr des 3 échantillons de <i>Culex quinquefasciatus</i> relévés par électrophorèse sur gel d'Agarose (Promega®).....	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taux d'éclosion des œufs du moustique <i>Culex quinquefasciatus</i> en fonction de la concentration en Suneem 1% après un traitement de 24 heures.....	47
Tableau 2 : Taux d'éclosion des œufs de moustique <i>Culex quinquefasciatus</i> en fonction de la concentration en Suneem 1% après un traitement de 48 heures.....	48
Tableau 3 : Pourcentage d'éclosion des œufs de <i>Culex quinquefasciatus</i> en fonction de la concentration en Suneem 1% après 72 heures.....	49
Tableau 4: Mortalités des larves de stades jeunes (stades L1 et L2) de <i>Culex quinquefasciatus</i> en fonction des concentrations en Suneem 1% après 24 heures de traitement.....	50
Tableau 5 : Mortalités des larves de stades jeunes (L1 et L2) de <i>Culex quinquefasciatus</i> en fonction des concentrations en Suneem 1% après 48 heures de traitement.....	51
Tableau 6: Mortalité des larves de stades âgés (stades 3 et 4) de <i>Culex quinquefasciatus</i> après un traitement de 24 heures avec le Suneem 1%.....	52
Tableau 7: Mortalités des larves de stades âgés (stades 3 et 4) de <i>Culex quinquefasciatus</i> après un traitement de 48 heures avec le Suneem 1%.....	53
Tableau 8 : Concentrations et densités optiques de l'ADN extrait par “ DNA IQ ”.....	98
Tableau 9: Concentrations et densités optiques de l'ADN extrait par “ Phénol-chloroform ”...98	
Tableau 10: Concentrations et densités optiques de l'ADN du portion du gène Kdr amplifié avant le séquençage.....	99
Tableau 11: Concentrations et densités optiques de l'ADN des 3 types d'échantillons.....	107
Tableau 12: récapitulatif des génotypes (traités et naturels) de <i>Culex quinquefasciatus</i>	10

ABBREVIATIONS

ADN: Adénosine Dsésoxyribonucléotique

Az : azadirachtine.

B: bocal

Caz : Concentration en azadirachtine ;

DSenCq^{G0}: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération zéro;

DSenCq^{G1}: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération un;

DSenCq^{G5}: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération cinq

EC: Emulsionnable concentré

HNF: huile de neem formulée,

HNP: huile de neem pure,

Kdr: knock down résistance

ml : millilitres ;

Pb: paires de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

PN: poudre de neem,

PTN: poudre technique de neem,

Q_{AZ} : quantité d'azadirachtine contenue dans un volume prélevé ;

THFA: Tetrahydrofurfuryl Alcool.

X (ml) : volume de Suneem prélevé ;

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
I. Introduction	2
II. GENERALITES	6
II.1 Bioécologie des moustiques.....	7
II.2. Morphologie et Anatomie des larves de moustique.....	7
A. Organisation externe	7
B. Organisation interne du tube digestif	8
II.3. Quelques généralités sur la résistance des vecteurs aux insecticides	8
II.3.1. Définition de la résistance.....	8
II.3.2. Différents mécanismes de résistance	8
a. La résistance métabolique	8
b. La résistance comportementale.....	8
b.1 Résistance associée à la mobilité de l'insecte.....	9
b. 2. Résistance associée à l'immobilité de l'insecte	9
c. La résistance par modification de la cible.....	9
d. Le canal sodium voltage-dépendant : une cible des insecticides.....	10
e. L'acétylcholinestérase.....	12
f. Les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA _r)	12
g. Autres cibles.....	12
h. L'acétylcholinestérase.....	12
i. Les bases moléculaires de la résistance aux insecticides.....	13
j. Surproduction de protéines	14

k. Mutations ponctuelles	14
--------------------------------	----

III. ETUDE DU NIVEAU DE SENSIBILITE DES ŒUFS, DES STADES JEUNES (L1 ET L2) ET AGES (L3 ET L4) DU MOUSTIQUE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* 17

III.1. Introduction.....	18
--------------------------	----

III.2. Matériel et méthodes.....	18
----------------------------------	----

III.2.1. Matériel.....	18
------------------------	----

III.2.1.1. Biopesticides pour l'étude de la sensibilité : Suneem 1%	18
---	----

III.2.1.2. Matériel biologique : œufs et larves de <i>Culex quinquefasciatus</i>	19
--	----

III.2.2. Méthodes.....	19
------------------------	----

III.2.2.1. Détermination des Concentrations Létales (CL).....	19
---	----

A. Stades jeunes (stades 1 et 2) des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i>	19
--	----

B. Stades âgés (stades 3 et 4) des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i>	20
--	----

III.2.2.2. Traitement des œufs de <i>Culex quinquefasciatus</i>	20
---	----

III.2.2.3. Traitement statistique des résultats	21
---	----

A. Correction des Taux Bruts de Mortalité (TBM)	21
---	----

B. Analyse statistique.....	21
-----------------------------	----

III.3 Résultats.....	26
----------------------	----

III.3.1 Sensibilité du moustique <i>Culex quinqueafsciatus</i> au stade œuf	26
---	----

III.3.2 Sensibilité du moustique <i>Culex quinqueafsciatus</i> au stade larve.....	26
--	----

A. Sensibilité des larves de stades 1 et 2	29
--	----

B. Sensibilité des larves de stades âgés (stades 3 et 4).....	31
---	----

III.4. Discussion	22
-------------------------	----

III.5. Conclusion	34
-------------------------	----

CHAPITRE IV : EFFETS HISTOPATHOLOGIQUES DU SUNEEM 1% SUR LES LARVES DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i>	35
IV.1 Introduction.....	36
IV.2. Matériel.....	36
IV.3 Méthode	36
IV.3.1 Microscopie électronique à transmission.....	36
IV. 4. Résultats.....	39
IV.4.1. effets pathologiques du Suneem 1% sur <i>Culex quiquefasciatus</i>	39
A. En microscopie photonique.....	39
A.1. Les témoins	39
A.2. Larves traitées	39
B. En microscopie électronique	44
B.1.Témoins.....	44
B.1.Traités.....	44
IV. 5. Discussion.....	53
IV. 6. Conclusion	55
CHAPITRE V : INDUCTION ET DETERMINATION DE LA RESISTANCE DU <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> AU SUNEEM 1%	56
V.1. Introduction.....	47
V. 2 Matériel et méthodes.....	58
V. 2.1 Matériel	58
V.2.1.1 Modèle d'étude : le moustique <i>Culex quinquefasciatus</i>	58
V.2.1.2 Pourquoi chercher à déterminer la résistance du <i>Culex quinquefasciatus</i>	61
V.3.1.3. Le produit bioinsecticide : Suneem 1% EC	61

V.2.2 Méthode	64
V.2.2. 1. Traitement des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> par le Suneem 1%.....	64
V.2.2.2. Les gènes étudiés	67
A. Préalables à l'étude des gènes	67
a. Choix des gènes.....	67
b. Recherche des séquences nucléotidiques.....	67
c. Détermination des amorces (ou Primers) PCR	67
B. Etude des gènes proprement dit	67
B.1. Extraction de l'ADN des 3 types d'échantillons du <i>Culex quinquefasciatus</i>	67
B.1.1. Extraction de l'ADN par la méthode du phénol-chloroform	68
B.1.2. Extraction de l'ADN par la méthode du DNA IQ.....	68
B.1.3. Amplification du gène kdr du canal sodium du <i>Culex quinquefasciatus</i>	69
B.1.4. Electrophorèse	70
B.1.5. Purification	70
B.1.6. Séquençage.....	75
B.1.7. Préparation de la réaction de séquençage de l'ADN	75
V.3. Résultats	75
V.3.1. Etudes de gènes de résistance du <i>Culex quinquefasciatus</i>	75
a. Les concentrations de l'ADN extrait et ses absorbances	75
b. Les amplicons du gène kdr du canal sodium voltage dépendant révélés par électrophorèse	78
V.3.2. Les résultats de séquençage des amplicons.....	80
V.4. Discussion	86
V.5. Conclusion	88

VI. CONCLUSION GENERALE PERSPECTIVES	89
VI.1 Conclusion	90
VI.2 Perspectives	91
VI.3 Recommandations.....	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92
ANNEXES	106

LES PUBLICATIONS EN ANNEXE

1. Raymond Demba Ndione, Mady Ndiaye, Omar Faye, José Marie Afoutou, Abdoulaye Dièye. Larvicidal and cytopathologic effects of Suneem 1% (neem: *Azadirachta indica*, A. Juss, Meliaceae) on mosquitoes vectors of diseases. **Topclass Journal of Herbal Medecine Vol. 2 (3) pp. 43-58, March, 2013-12-05**

2. Raymond Demba Ndione, Mady Ndiaye, Ioan Moglan, Lucian Gorgan. Knockdown (kdr) mutation in 1% Suneem (*Azadirachta indica*, A. Juss) resistance mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), 2013, **Topclass Journal of Herbal Medecine vol. 4 (1): 9-15**

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les moustiques sont des insectes diptères qui colonisent l'écosystème aquatique sous trois formes (œufs, larves et nymphes) et les écosystèmes terrestre et aérien sous la forme d'adultes. Ils constituent un intérêt pour la recherche-développement et aussi pour celle fondamentale car ils sont pour la plupart transmetteurs de parasites et virus responsables de beaucoup de maladies (paludisme, dengue, fièvre-jaune, filarioses, arboviroses etc.). Les moustiques sont aussi à l'origine de nuisances (piqûres, bourdonnements). L'espèce *Culex quinquefasciatus* est responsable de maladies comme les filarioses (exemple : la filariose lymphatique), les encéphalites (exemple : l'encéphalite japonaise). Ces maladies ont des impacts économique et social très négatifs dans beaucoup de pays d'Afrique comme le Sénégal. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies dues aux moustiques provoquent jusqu'à 1 à 3 millions de décès chaque année, un enfant en meurt toutes les 30 secondes. Les pathologies dues aux moustiques menacent 2 milliards d'individus et atteignent plus de 500 millions de personnes par an dans plus de 100 pays ou territoires. Ces pathologies frappent davantage les zones tropicales d'Asie, d'Amérique latine et surtout d'Afrique avec des conséquences négatives pour la santé, le bien-être, l'économique et le social.

Il est par conséquent urgent et impératif de lutter contre *Culex quinquefasciatus*. Pour cela, des méthodes mécaniques (remblayage et destruction des gîtes naturels et artificiels), chimiques (pulvérisation d'insecticides chimiques de synthèse dans les gîtes), biochimiques (extraits naturels de plantes à potentiel insecticide) et biologiques (utilisation d'agents biologiques pathogènes) sont utilisées. Cependant, force est de noter que certes les méthodes de lutte donnent des mortalités au niveau des moustiques mais il n'en demeure pas moins qu'ils présentent de plus en plus quelques insuffisances comme la résistance des parasites aux médicaments mais aussi celle des moustiques aux insecticides. En effet, l'utilisation des insecticides chimiques de synthèse présente des inconvénients notamment leur toxicité envers les espèces non-cibles, leur rémanence et surtout les résistances multiformes développées. En 1975, Apperson et Georghiou ont montré une multi-résistance des larves de *Culex tarsalis* aux pesticides organophosphorés. Konan *et al.* (2003) ont, quant à eux montré une résistance de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 à la Deltaméthrine. Mouchet *et al.* (1960) ont aussi montré une résistance du *Culex pipiens*

fatigans (Wied) à divers insecticides comme le D.D.T. (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane), la Dieldrine et le H.C.H (Hexachlorocyclohexane). Plusieurs mécanismes sont décrits comme étant à l'origine de la résistance et se traduisent le plus souvent par des modifications comportementales, physiologiques et biochimiques :

- la résistance comportementale s'observe au niveau de l'insecte qui présente un comportement différent, empêchant l'élément toxique d'agir (Haubruge et Amichot, 1998) ;
- la résistance physiologique s'exprime au niveau des tissus et organes ; elle est caractérisée par une diminution de la pénétration ou par une augmentation de l'excrétion des insecticides (Haubruge et Amichot, 1998) ;
- la résistance biochimique se situe au niveau cellulaire. Elle consiste d'une part en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de détoxification et d'autre part en une diminution de l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides (Haubruge et Amichot, 1998).

Face à ces résistances, les acteurs de la lutte contre les moustiques ont développé d'autres stratégies par l'utilisation de biopesticides (Haubruge et Amichot, 1998). Ces biopesticides sont parfois des dérivées de plantes comme les produits insecticides à base de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss). Ces biopesticides à base de neem comme le Suneem 1% sont efficaces contre les moustiques (Ndione *et al.*, 2006, Sèye *et al.*, 2006 a, Sèye *et al.*, 2006 b, Ndione *et al.*, 2007). Malgré cette efficacité, une espèce comme *C. quinquefasciatus* commence à développer de plus en plus une résistance aux biopesticides à base de neem. Ce constat a été fait durant nos bioessais en conditions de laboratoire mais aussi durant les traitements des moustiques en milieux semi-naturel et naturels. Les résultats de recherche de Ndiaye (2010) ont montré une insensibilité du moustique *C. quinquefasciatus* à la génération 5 (G5). Ce constat vient renforcer l'idée à laquelle il existerait un gène qui serait à l'origine d'une résistance du *C. quinquefasciatus* au Suneem 1%.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la détermination d'un gène de résistance au niveau des générations de moustique *C. quinquefasciatus* qui ont survécues aux traitements par le Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss). Nous avons entrepris alors d'étudier la résistance du *C. quinquefasciatus* au Suneem 1% EC pour mieux appréhender ce problème pour ainsi mener une lutte efficace.

Dans ce travail, nous posons comme hypothèse qu'une résistance du *C. quinquefasciatus* au Suneem 1% serait due à une sensibilité moindre ou réduite des canaux sodiques voltage-dépendant au Suneem 1% correspondant à une mutation kdr et/ou à une surproduction d'enzymes détoxifiantes telles que les estérases.

L'intérêt de ce travail est double. D'un point de vue fondamental, la connaissance et la compréhension d'une résistance du moustique *C. quinquefasciatus* au Suneem 1% EC stimuleraient nos recherches et pourraient apporter un plus à la science. Et d'un point de vue appliqué, il est nécessaire de mettre au point un système de lutte efficace non polluant, qui passe par la compréhension globale des résistances. Ce travail de recherche revêt un caractère original en ce sens qu'au Sénégal et ou bien même en Afrique, il y a peu de travaux scientifiques publiés sur les résistances des moustiques aux produits bioinsecticides comme les extraits de plantes comme le neem (*Azadirachta indica*, A. Juss).

L'objectif général de cette thèse est de déterminer la résistance du moustique *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1% pour ainsi arriver à mettre au point un biopesticide efficace contre les moustiques.

Pour atteindre cet objectif général, nous nous sommes fixés un certain nombre d'objectifs spécifiques :

- (1) : déterminer les effets du Suneem sur les œufs en déterminant les concentrations d'éclosion et de non-éclosion des œufs de *Culex quinquefasciatus*;
- (2) : déterminer les doses létales 50 (DL 50) et celles 90 (DL 90) des larves de moustiques de stades 1, 2, 3 et 4 ;
- (3) : déterminer les effets cytopathologiques et histopathologiques du Suneem sur *Culex quinquefasciatus*,
- (4) : déterminer le type de résistance du moustique au Suneem 1% EC,
- (5) : mettre en évidence le ou les gènes responsable(s) de la résistance du moustique au Suneem 1%,
- (6) : déterminer la ou les mutations au niveau du génome qui serai(en)t à l'origine d'une insensibilité ou d'une résistance des larves de *C. quinquefasciatus*.

Dans ce mémoire, nous avons présenté successivement :

- ✓ un chapitre 1 portant sur des généralités sur les moustiques et les résistances ;
- ✓ un chapitre 2 axé sur deux niveaux :
 - un premier niveau où sont abordés de manière succincte la morphologie des larves de *C. quinquefasciatus* et leur bioécologie ;
 - un deuxième niveau où une revue synthétique de la résistance des moustiques et même d'autres insectes est présentée ;
- ✓ un chapitre 3 portant sur le niveau de sensibilité des œufs, des stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) du moustique *C. quinquefasciatus*. Ce chapitre est abordé sous deux angles :
 - un premier angle où est déterminée la mortalité des larves de *C. quinquefasciatus* en fonction de la concentration et de la durée du traitement (CL50 et CL90) ;
 - un deuxième angle où sont déterminées les concentrations létales 50 et 90 d'éclosion et de non-éclosion des œufs.
- ✓ Chapitre IV Il sera abordé par l'étude des effets cytopathologiques et histopathologiques dus à l'action de l'azadirachtine du Suneem 1% sur les larves de *Culex quinquefasciatus*.
- ✓ Chapitre V : l'induction et la détermination de la résistance du *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%. Ce chapitre sera abordé sous deux angles:
 - détermination du type de résistance du *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1% ;
 - détermination du niveau de résistance du *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%
 - détection des mutations pouvant être à l'origine d'une résistance du *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%.

II. GENERALITES

II.1. Bio-écologie des moustiques

Lors de leur reproduction, les femelles de moustiques fécondées par les mâles déposent leurs œufs à la surface d'eaux stagnantes ou sur des surfaces inondées. Les œufs ont des formes variables suivant les genres :

- isolés et munis de flotteurs ce qui les rend insubmersibles (cas du genre *Anopheles*),
- groupés en barquettes flottantes de 50 à 300 œufs (cas du genre *Culex*),
- isolés de couleur noire acquise après la ponte (cas du genre *Aedes*).

L'éclosion des œufs donnent des larves qui ressemblent à des vers dépourvues de pattes et d'ailes. Elles sont constituées de plusieurs segments (croissance discontinue par mues) et mesurent environ 2 à 12 mm. Les larves sont le plus souvent détritiphages (cas du genre *Culex*), certaines sont prédatrices ou même cannibales (cas des genres *Culex tigripes*, *Toxorhynchites sp*). Le développement larvaire des *Culicidae* se caractérise par deux phases distinctes formant un cycle :

- une phase pré-imaginale qui se déroule en milieu aquatique et regroupe l'œuf, les quatre stades larvaires stade 1 (L₁), stade 2 (L₂), stade 3 (L₃), stade 4 (L₄). Le passage d'un stade au suivant se fait par une mue (mue larvaire) et le dernier stade est la nymphe. Elle est obtenue par métamorphose de la larve de stade 4.
- une phase aérienne, l'adulte ou imago. En effet, au terme d'une métamorphose complète, la nymphe se transforme en adulte. Les moustiques sont donc des insectes holométaboles. La plupart des femelles de moustiques ont besoin d'un repas de sang des vertébrés pour embryonner leurs œufs (espèces dites anautogènes). Certaines comme le genre *Toxorhynchites* n'ont pas besoin de sang pour assurer la maturation de leurs ovules (Ndiaye, 1990) (espèces dites autogènes). Les mâles par contre se nourrissent de jus sucrés, nectars et autres sécrétions végétales.

II.2. Morphologie et anatomie des larves de moustiques

A. Organisation externe

Les larves de moustiques (*Cx quinquefasciatus*, *A. aegypti*, et *An. gambiae s.l.*) sont vermiformes. Elles sont dépourvues d'appendices locomoteurs mais possèdent :

- une tête portant des soies antennaires, des soies frontales, des antennes et des yeux ;
- un thorax avec des soies thoraciques ;

- un abdomen portant huit tergites abdominaux, un segment anal avec ou sans siphon respiratoire. En effet, les larves de *Culex quinquefasciatus* et d'*Aedes aegypti* possèdent un siphon respiratoire. Alors que celles d'*Anopheles gambiae s.l.* en sont dépourvues .

B. Organisation du tube digestif

Les larves de moustique ont un tube digestif qui débute par la bouche, puis l'œsophage. Ce dernier se termine par deux expansions latérales appelées caeca gastriques. Le tube digestif se poursuit par l'intestin antérieur, moyen, postérieur et se termine par l'iléon et l'anus. Au niveau de l'intestin postérieur partent des tubes de Malpighi (organes excréteurs). La colonne alimentaire se trouve dans la lumière du tube digestif. Entre cette dernière et l'apex des cellules intestinales, on rencontre la membrane péritrophique dont le rôle est de protéger les cellules intestinales des particules alimentaires en abrasion.

II.3. Quelques généralités sur la résistance des vecteurs aux insecticides

II.3.1. Définition de la résistance

La résistance peut être définie comme la capacité d'un organisme donné à survivre à des doses d'un produit toxique qui auraient dû normalement le tuer. Ce caractère est héréditaire et est sous la dépendance de gènes (Guillet, 1995 cité par Diarrassouba, 2003).

II.3.2. Différents mécanismes de la résistance

a. La résistance métabolique

La résistance métabolique est le mécanisme le plus commun chez les insectes en général et les moustiques surtout l'espèce *Culex quinquefasciatus*. Ce mécanisme repose sur des systèmes enzymatiques que tous les insectes possèdent pour assurer une détoxification naturelle des éléments toxiques étrangers. Généralement trois catégories d'enzymes interviennent dans cette fonction de détoxification à savoir les estérases, les monooxygénases à cytochromes P450 et les glutathion-S-transférases. Ces enzymes sont surproduites par les moustiques résistants par rapport aux moustiques sensibles et leur permettent de métaboliser ou de dégrader les molécules d'insecticides avant qu'elles n'exercent un effet toxique sur leur cible. La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme 14 ou à une augmentation du nombre de copies des gènes qui codent ces enzymes (Devonshire et Moore, 1982).

b. La résistance comportementale

La résistance comportementale repose sur une modification du comportement de l'insecte lui permettant d'éviter un contact avec la molécule d'insecticide. La résistance comportementale est moins bien connue que les autres mécanismes de résistance (Djogbénoù, 2009). Depuis la mise en évidence de mécanismes comportementaux dans la résistance aux insecticides en 1956 (Lockwood *et al.*, 1984), peu de recherches ont été effectuées dans ce domaine. L'approche expérimentale d'une telle résistance n'est pas facile à concevoir, car tout changement dans le comportement est difficile à quantifier en laboratoire.

b.1 Résistance associée à la mobilité de l'insecte

Le mécanisme de résistance comportementale peut être dépendant du stimulus, ce qui implique une reconnaissance de la substance toxique par des récepteurs sensoriels de l'insecte, créant une irritabilité (ce qui pousse l'insecte à quitter l'environnement toxique au contact de l'insecticide) et une répulsion (qui permet à l'insecte d'éviter le contact avec le pesticide) (Davidson, 1953 cité par Haubruge et Amichot, 1998). Ce type de mécanisme se rencontre essentiellement chez les diptères. Les adultes de *Haematobia irritans*, au contact de la perméthrine ou de la deltaméthrine, augmentent leur mobilité de manière à minimiser le temps de contact avec le pesticide (Lockwood *et al.*, 1984 cité par Haubruge et Amichot, 1998).

b. 2. Résistance associée à l'immobilité de l'insecte

Ce type de résistance comportementale correspond à la possibilité pour l'insecte de limiter le temps de contact avec le pesticide. Par exemple, la diminution de l'activité locomotrice des larves résistantes de *Heliothis virescens* est une réponse comportementale provoquée par la présence d'un pyréthrianoïde. Après 6 heures sur une surface de verre traitée avec 0,03 µg de perméthrine, les chenilles résistantes d'*Heliothis virescens* ont été en contact avec 0,5% de la quantité de pyréthrianoïde déposée, alors que les larves sensibles portent plus de 5% de la perméthrine appliquée (Sparks *et al.*, 1989 cité par Haubruge et Amichot, 1998). Des individus de certaines souches d'*Haematobia irritans* résistantes aux pyréthrianoïdes fréquentent les régions ventrales et postérieures non traitées des bovins possédant à l'oreille une étiquette imprégnée de pesticides (Georghiou, 1990 cité par Haubruge et Amichot, 1998).

c. La résistance par modification de la cible

Le second type de mécanisme de résistance communément trouvé chez les insectes est la modification de la cible de l'insecticide. Les principales cibles des insecticides sont des

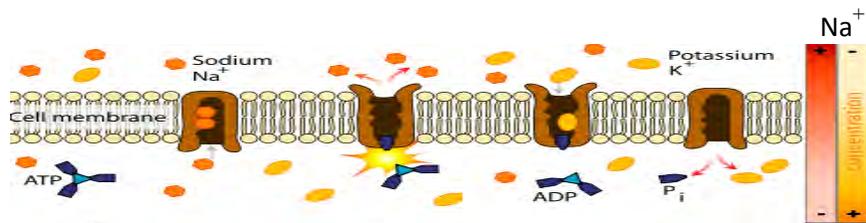
récepteurs ou des enzymes du système nerveux : l'acétylcholinestérase (AChE), le canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) et le récepteur de l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Les mutations au niveau de la cible sont des mécanismes de résistance très efficaces qui s'accompagnent de phénomènes de résistance croisée pour tous les insecticides agissant sur la même cible. La cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme située dans les synapses des cellules nerveuses. Les insecticides des familles des carbamates et des organophosphorés agissent sur l'acétylcholinestérase en l'inhibant, ce qui entraîne la mort de l'insecte par accumulation de l'acétylcholine (substrat de l'enzyme) dans la fente synaptique. Plusieurs formes mutées de cette enzyme (également appelées acétylcholinestérase insensible) ont présenté une affinité diminuée pour ces insecticides. La forme mutée retrouvée chez *Anopheles gambiae s.l.* principal vecteur du paludisme en Afrique inter-tropicale, résulte d'une mutation de la glycine en sérine en position 119 conférant une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés. Les canaux sodium voltage dépendant (CNaVdp) et certains biopesticides à base de neem interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Les pyréthriinoïdes et le DDT agissent au niveau des CNaVdp et perturbent le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses. Une mutation ponctuelle remplaçant une leucine par une phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant le CNaVdp (mutation *kdr* Leu-Phe) confère la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT en Afrique de l'Ouest. En Afrique de l'Est, c'est plutôt le remplacement de la leucine par une serine à la même position qui confère la résistance aux pyréthriinoïdes (mutation *kdr* Leu-Ser). Les organochlorés du groupe des cyclodiènes ont leur site d'action au niveau des récepteurs du GABA du système nerveux central. Une seule mutation ponctuelle sur des récepteurs GABA est responsable de la résistance aux cyclodiènes chez plusieurs espèces d'insectes. Tout comme dans le cas de l'AChE1, cette mutation entraîne une modification structurale du site d'action réduisant ainsi la fixation des cyclodiènes (Djogbénu, 2009).

d. Le canal sodium voltage-dépendant : une cible des insecticides

Les canaux sodiques voltage-dépendant sont responsables de la phase de dépolarisation du potentiel d'action dans les membranes dans tous les types de cellules excitables comme les cellules nerveuses et musculaires (Catterall *et al.*, 2005). Le canal sodium chez les insectes est la principale cible des pyréthriinoïdes et de beaucoup d'insecticides similaires (Narahashi, 1996).

Ces insecticides exercent des effets toxiques sur la plupart des insectes en se liant au canal sodium voltage dépendant, altérant ainsi ses propriétés d'ouverture et de fermeture normales. Ils gardent ainsi le canal ouvert pendant un temps anormalement long. Cela prolonge l'écoulement du courant de sodium qui à son tour élève et prolonge la phase de dépolarisation du potentiel d'action de la membrane du neurone et donc initie les décharges répétitives et empêche la phase de repolarisation des potentiels d'action. D'après Xu *et al.* (2005), des modifications dans la structure du canal sodium tels que des mutations ponctuelles ou des substitutions peuvent réduire considérablement la sensibilité aux insecticides. Cette sensibilité peut se traduire soit par une réduction ou une élimination de l'affinité de la liaison des insecticides à des protéines diminuant ainsi les effets toxiques et conférant la résistance aux insecticides. La réduction de la sensibilité des sites cibles des canaux sodiques, qui est connue pour être l'un des principaux mécanismes de résistance aux insecticides, est appelée la résistance knockdown (Kdr) (Soderlund et Knipple, 2003). Des études ont souligné l'implication de mutations ponctuelles dans les canaux sodiques voltage-dépendant dans la résistance kdr (Xu *et al.*, 2006, Xu *et al.* 2011, Sakar *et al.*, 2009, Dong *et al.*, 1998). Parmi ces mutations kdr, il y a la substitution de la leucine à la phénylalanine (L à F), celle de leucine à l'histidine (L à H) ou de la Leucine à la Sérine (L à S) dans le segment 6 du domaine II (IIS6) du chromosome. Ces mutations résultent tous d'un polymorphisme nucléotidique simple (PNS) qui dans le cas des moustiques est un changement du codon TTA par le codon TTT. Cette mutation est clairement associée à une résistance aux pyréthrinoides et autres insecticides.

Milieu extracellulaire



Milieu intracellulaire

K⁺

Figure 1: Coupe schématique de la membrane plasmique avec le canal sodium-potassium avec la pompe Na⁺/K⁺-ATPase voltage-dépendant dans ses différentes activités (www. wikipedia.org)

e. L'acétylcholinestérase (AChE)

La protéine la mieux connue en tant que cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase. Cette enzyme est indispensable au bon fonctionnement des synapses cholinergiques. Chez les insectes, elle se trouve essentiellement dans le système nerveux central. L'influx nerveux arrivant dans la terminaison présynaptique entraîne une libération d'acétylcholine (ACh) qui se fixe sur des récepteurs placés sur la membrane post-synaptique. Cette fixation permet l'ouverture des canaux sodium et potassium, laquelle entraîne la dépolarisation à l'origine de l'influx nerveux sur l'élément post-synaptique. Le rôle de l'acétylcholinestérase est d'hydrolyser l'acétylcholine ce qui permet la fermeture des canaux associés au récepteur du neurotransmetteur. Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique se trouve continuellement excitée. Les organophosphorés et les carbamates agissent en inhibant l'activité catalytique de l'AChE. Ils se fixent en effet sur le site actif de l'enzyme, à la place de l'acétylcholine. L'accumulation de l'ACh dans la région synaptique provoque une hyperexcitation des liaisons cholinergiques causant finalement la mort de l'insecte. Chez certains insectes comme *Culex pipiens*, de fortes concentrations d'organophosphorés et de carbamates, avoisinant parfois même la limite de solubilité, n'inhibent plus l'AChE (Raymond *et al.*, 1985). Chez les acariens, on a trouvé une résistance au diazoxon associée à une modification de l'acétylcholinestérase (Smitsaert, 1964). Ce mécanisme a été également identifié chez d'autres acariens et insectes : *Musca domestica* (Tripathi O'Brien, 1973), *Spodoptera littoralis* (Zaazou *et al.*, 1973), *Anopheles albimanus* (Ayad, Georghiou, 1975), *Drosophila melanogaster* (Fournier *et al.*, 1992a), *Tetranychus kanzawai* (Kuwahara *et al.*, 1982), *Nephotettix cincticeps* (Hama, Iwata, 1971), *Culex pipiens* (Raymond *et al.*, 1985), *Culex pipiens* (Bourguet *et al.*, 1997), *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu, Clark, 1993) et *Rhyzopertha dominica* (Guedes *et al.*, 1997).

f. Les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA_r)

Les GABA_r sont les cibles de nombreux insecticides organohalogénés, dont la dieldrine et le lindane. Ces insecticides se fixent au récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique et inhibent le fonctionnement du canal chlore qui lui est associé. L'ouverture de ce canal induit une hyperpolarisation de la membrane nerveuse et son inactivation, lorsqu'elle se prolonge, perturbe l'ensemble du fonctionnement du système nerveux. La résistance à la dieldrine a été mise en évidence chez *Musca domestica*, *Aedes aegypti* et *Periplaneta americana* mais aussi chez *Lucilia*

cuprina (Hughes, Mc Kenzie, 1987). Ce type de résistance est bien conservé entre les invertébrés et le poisson mouche *Gambusia affinis* (Yarbrough *et al.*, 1986). De plus, il présente une résistance croisée avec le picrotoxine, alcaloïde antagoniste des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique au niveau des canaux chlorure (Deng *et al.*, 1991). Les résultats pharmacologiques ont ensuite permis de montrer que la résistance à la dieldrine est associée à une modification de l'affinité de l'insecticide vis-à-vis du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique, notamment chez *Tribolium castaneum* et *Drosophila melanogaster* (French-Constant *et al.*, 1993).

g. Autres cibles

De nouveaux insecticides, naturels ou synthétiques, sont constamment testés. Quels qu'ils soient, nous pouvons déjà prévoir que nous serons confrontés à des phénomènes de résistance. Il existe déjà des souches de drosophiles qui résistent au parasitisme par encapsulation effectué par des microhyménoptères. Les larves de *Spodoptera exigua* peuvent devenir insensibles aux inhibiteurs de protéinases présents dans les feuilles de tabac génétiquement modifiées (Jongsma *et al.*, 1995). Or, l'utilisation de parasitoïdes et de plantes génétiquement transformées sont des voies explorées pour trouver des alternatives à la méthode de lutte chimique. Un autre exemple bien documenté de résistance aux biopesticides concerne les toxines protéiques produites par *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus sphaericus*. Ces toxines se fixent sur des récepteurs spécifiques du tube digestif de lépidoptères. Ceci a pour effet d'induire la destruction de ce tissu entraînant ainsi la mort de l'insecte. Si l'on sélectionne des insectes pour leur résistance envers une ou plusieurs toxines bactériennes, on obtient une souche résistante vis-à-vis de *B. sphaericus* et *B. thuringiensis* ; la résistance est associée à une réduction de l'affinité du récepteur de type aminopeptidase au niveau du tube digestif (Van Rie *et al.*, 1990). Ce phénomène, bien qu'observé en laboratoire, n'a pas encore été rencontré dans des conditions naturelles. Ceci est probablement dû au fait que les traitements par épandage de bactéries produisent un mélange de toxines. Il en sera probablement autrement lorsque l'on travaillera avec une seule toxine, comme dans le cas des plantes transgéniques produisant une seule de ces toxines.

h. Les bases moléculaires de la résistance aux insecticides

La biologie moléculaire a permis de mettre en évidence deux mécanismes responsables des phénomènes observés.

i. Surproduction de protéines

Chez *Culex pipiens* et *Myzus persicae*, la production élevée d'estérases détoxifiant les insecticides est liée à une amplification génique. Chez *Myzus persicae*, le gène d'une estérase (E4), détoxifiant les organophosphorés et les carbamates, est présent à raison de 12 copies dans le génome (Field *et al.*, 1996). Une souche de *Culex quinquefasciatus* résistante aux organophosphorés (facteur de résistance de 800X) possède jusqu'à 250 copies d'un gène codant pour une estérase appelée "Estérase B1" (Mouchès *et al.*, 1990). La résistance liée aux cytochromes P-450 peut aussi être due à une surproduction d'une ou plusieurs P450. Ce phénomène a été clairement identifié dans des souches de mouche (Feyereisen *et al.*, 1989 ; Cariño *et al.*, 1994), de drosophile (Waters *et al.*, 1992 ; Brun *et al.*, 1996) ou de *Heliothis virescens* et de *Helicoverpa armigera* (Pittendrigh *et al.*, 1997) résistantes à différents insecticides. Dans ce cas, il s'agit probablement d'un facteur de régulation agissant en trans qui est altéré. La combinaison de sa surexpression avec la présence de mutations ponctuelles conduirait à l'existence de drosophiles capables de survivre sur du DDT cristallisé (Brun *et al.*, 1996). La disponibilité de plusieurs séquences codant pour des cytochromes P-450 d'insectes pourrait accélérer les recherches sur la structure, la diversité et la régulation des cytochromes P-450 et permettre la compréhension des mécanismes moléculaires en cause (Waters *et al.*, 1992 ; Tomita, Scott, 1995). En ce qui concerne les glutathion S-transférases, les données disponibles, chez la mouche domestique, laissent penser qu'il s'agirait d'un mécanisme voisin de celui des cytochromes P-450 à savoir une surexpression de GST sans amplification génique et un accroissement de l'activité spécifique d'une ou plusieurs GST, lié à une insertion de nucléotides causant l'addition d'acides aminés au niveau de la protéine (Fournier *et al.*, 1992b ; Franciosa, Bergé, 1995).

j. Mutations ponctuelles

Une ou plusieurs mutations ponctuelles peuvent modifier l'activité d'une enzyme de façon à ce qu'elle métabolise mieux les insecticides. Cette possibilité est très probable pour les P450s et les GSTs ; son existence a été démontrée pour les estérases. L'hypothèse de la mutation au niveau des estérases avait été émise pour expliquer que certaines souches de *Musca domestica* étaient devenues résistantes aux organophosphorés (Oppenoorth, Van Asperen, 1960). L'enzyme mutée aurait perdu une partie de son activité vis-à-vis de l'ester de naphtyle et dégraderait préférentiellement l'insecticide. Les travaux effectués sur *Lucilia cuprina* et *Culex tarsalis*

semblent confirmer cette théorie (Whyard *et al.*, 1994a ; 1994b). Une carboxylestérase dégradant spécifiquement le malathion (MCE) a été purifiée à partir d'une souche résistante de *Lucilia cuprina*. L'activité catalytique élevée vis-à-vis du malathion suggère une modification qualitative de cette enzyme ; en effet, la MCE dégrade ces insecticides mille fois plus rapidement que les estérases de *Myzus persicae* hydrolysant les organophosphorés. Les propriétés cinétiques de l'enzyme chez la souche sensible et la souche résistante n'ont cependant pas été directement comparées. Une MCE purifiée à la fois chez la souche sensible et chez la souche résistante de *Tribolium castaneum* possède une affinité plus élevée pour le malathion et une moins bonne affinité à l'égard de l'ester de naphthyle, chez la souche résistante que chez la souche sensible. Bien entendu, si une mutation peut rendre une enzyme capable de dégrader un insecticide, le même type de modification peut diminuer la sensibilité d'une cible envers un insecticide. Celle-ci dépend de la structure du site de liaison, elle-même fonction de la séquence en acides aminés de la protéine. Le séquençage du gène codant pour le C_{svd} révèle deux substitutions (d'une leucine en phénylalanine et d'une méthionine en thréonine) chez plusieurs souches résistantes de type super-*kdr* chez *Musca domestica*, induisant la perte d'une charge négative qui serait responsable de la diminution de la toxicité du pyréthrianoïde à l'égard de cette souche (Williamson *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été observés chez une souche de drosophile résistante à la deltaméthrine (Amichot *et al.*, 1992). La résistance serait liée chez l'insecte à la présence d'une ou plusieurs mutations ponctuelles, entraînant un changement d'un ou de plusieurs acides aminés. Au niveau du gène codant pour le C_{svd}, on a pu identifier une mutation **170** d'une leucine en histidine chez *Heliothis virescens* (Park *et al.*, 1997) et d'une leucine en phénylalanine chez *Blattella germanica* (Dong, 1997) et chez *Haematobia irritans* (Guerrero *et al.*, 1997). Dans le cas de l'acétylcholinestérase, les mutations affecteraient la structure de l'enzyme de telle sorte que l'accès au site catalytique est rendu plus difficile pour l'insecticide. Ainsi, chez la drosophile, la résistance au malathion provient d'une mutation ponctuelle où la phénylalanine en position 368 est remplacée par la tyrosine (Fournier, Mutero, 1994). Quant à la résistance élevée aux organosphosphorés chez *Drosophila melanogaster*, elle implique plusieurs mutations (Fournier *et al.*, 1992a). Ce phénomène moléculaire peut être également observé pour la résistance à l'égard d'insecticide ayant le récepteur de l'acide gammaaminobutyrique pour cible. La comparaison des séquences du gène du récepteur codant pour les allèles issus de souches sensibles ou résistantes à la dieldrine a montré que les

substitutions d'une alanine en glycine ou en sérine constituent les seules différences entre une souche sensible ou résistante (ffrench-Constant *et al.*, 1993). Les mesures électrophysiologiques montrent d'une part, que le GABA_r muté *in vitro* présente la même pharmacologie que celle du GABA_r obtenu à partir d'une souche résistante et d'autre part, qu'il est insensible à la dieldrine. Lorsqu'on considère des résistances de niveau élevé par modification du GABA_r, c'est toujours la même mutation qui induit la résistance, quel que soit l'insecte : *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica*, *Aedes aegypti*, *Tribolium castaneum*) (ffrench-Constant, 1994 ; Thompson *et al.*, 1993).

**III. ETUDE DE LA SENSIBILITE DES ŒUFS, DES
PREMIERS (L1 et L2) ET DERNIERS (L3 et L4)
STADES LARVAIRES DU MOUSTIQUE *CULEX*
*QUINQUEFASCIATUS***

III.1. INTRODUCTION

Ces dernières années, de nombreuses études portant sur la sensibilité des insectes en général et du moustique en particulier aux produits naturels à caractère insecticide ont été réalisées dans le monde. Ces études ont montré une sensibilité nette de divers produits insecticides (*Atlanta monophylla*, *Citrus hystrix* DC., *Curcuma longa* L., *Cymbopogon winterianus* Jowitt, *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus*, *Balanites aegyptiaca*, pyrethrum, citronelle, *Angelica archangelica* L., *Satureja hortensis* L., pogam, etc.) sur des coléoptères (Jenkins *et al.*, 2003, Pavela, 2009), des lépidoptères (Pavela et Vrchotova, 2013), des teignes de crucifères et de choux, des diptères (Tyrell *et al.*, 1979; Ruas Neto *et al.*, 1994; El hag *et al.*, 1999; Pushpalatha et Muthukrishnan, 1999; Khan et Ahmed 2000; Tawatsin *et al.*, 2001; Colignon *et al.*, 2003; Hadis *et al.*, 2003; Barnard et Rui-de-xue, 2004; Beckage *et al.*, 2004; Sivagnaname et Kalyanasundaram, 2004; Wilson *et al.*, 2005; Weisman et Chapagain, 2005; Aouinty *et al.*, 2006). Des études, portant sur la sensibilité des moustiques aux produits biopesticides à base de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) ont aussi été réalisées en Afrique et dans le monde. On peut citer entre autres les travaux de Mishra *et al.*, 1995; Azmi *et al.*, 1998; Batra *et al.*, 1998; Tianyun Su et Mulla, 1998; Tianyun Su et Mulla, 1999; Raguraman et Singh, 1999; Scott et Kaushik, 2000; Siddiqui *et al.*, 2000; Ravindran *et al.*, 2002; Aliero, 2003; Wandscheer, 2004, Pavela *et al.*, 2006. Des études portant sur la sensibilité du *Culex quinquefasciatus* à divers produits ont été faites (Pavela, 2007, Pavela, 2009). Au Sénégal, des études portant sur la sensibilité des larves de *C. quinquefasciatus* aux produits de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) ont aussi été effectuées. On peut citer des travaux de Seye, 2004; Sèye, 2006; Ndione, 2004; Seye *et al.*, 2006 a; Seye *et al.*, 2006 b; Ndione *et al.*, 2006; Ndione *et al.*, 2007. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de continuer ces études en s'intéressant cette fois-ci à la sensibilité de la phase aquatique (œufs et larves) de *C. quinquefasciatus* au Suneem 1%.

III.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

III.2.1. MATÉRIEL

III.2.1.1. Biopesticide pour l'étude de la sensibilité : Suneem 1%

Le biopesticide utilisé pour étudier la sensibilité des œufs, des larves de premiers stades (stades 1 et 2) et de stades avancés (stades 3 et 4) du *Culex quinquefasciatus* est le Suneem 1% EC (concentré liquide avec 10 g/l d'azadirachtine). Il a été fourni par les laboratoires de la

SENCHIM*. La procédure de fabrication est la suivante : après récolte des graines de neem, celles-ci sont décortiquées et transformées en amande. Après pressage à froid, les amandes ont donné de l'huile de neem pure (HNP) et des tourteaux. A l'huile de neem pure, un surfactant (ou émulsifiant) et un solvant (le Tétra Hydro Furfuryl Alcool : THFA) ont été ajoutés pour obtenir le Suneem 1%.

III.2.1.2. Matériel biologique : œufs et larves de *Culex quinquefasciatus*

Les larves de *Culex quinquefasciatus* ont été obtenues à partir d'œufs récoltés dans les bacs d'élevage du Département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar de dimensions 50 x 50 x 30 cm et lors des sorties de prospection et d'échantillonnage dans la banlieue dakaroise (Pikine, Guédiawaye, Parcelles Assainies). Une partie des œufs récoltés a été immergée dans de l'eau de robinet contenue dans des bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm. Les larves de stade 1 (L₁) obtenues après éclosion sont nourries avec de la poudre de pain pour obtenir, après des croissances et mues successives, des larves de stade 2 (L₂), de stade 3 (L₃), de stade 4 (L₄) et des nymphes. Par ailleurs, l'élevage des larves a été fait dans les conditions du laboratoire à savoir une température comprise entre 25°C et 30°C, une Humidité Relative (H.R.) d'environ 82% ± 10% et un taux de saturation de 75% ± 10%. Ces données sont enregistrées chaque jour à l'aide d'un thermomètre et d'un hygromètre. L'autre partie des œufs a été utilisée pour tester la sensibilité du *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%.

III.2.2.MÉTHODE

III.2.2.1. Détermination des Concentrations Létales (CL)

A. Premiers stades (stades 1 et 2) des larves de *Culex quinquefasciatus*

La sensibilité des larves de premiers stades (stades 1 et 2) de *Culex quinquefasciatus* est déterminée en utilisant dix bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm et un bocal témoin. Dans chaque bocal, nous avons mesuré 500 ml d'eau distillée puis immergé 100 larves de *Culex quinquefasciatus*. Ensuite, nous avons ajouté une pincée de poudre de pain pour nourrir les larves de *Culex quinquefasciatus* pendant l'expérience. Par la suite, nous avons ajouté 0,10 ml de Suneem 1% dans le premier bocal (B1). Pour passer d'un bocal à un autre, nous avons ajouté une quantité de 0,10 ml Suneem 1% à celle précédente. Le 10^{ième} bocal (B10) correspond alors à une quantité de 1ml de Suneem 1% ajoutée aux 500 ml d'eau distillée. Pour chaque bocal, nous avons répété le traitement trois fois. Les constats pour déterminer les taux bruts de mortalité et les taux de larves survivantes sont faits après 24 heures et 48 heures de traitement. Les

* : SENCHIM : Groupe Industries Chimiques du Sénégal (Chemistry Industry Group of SENEGAL), Km 13 Route de Rufisque BP 21236 Dakar- Sénégal.

concentrations en azadirachtine correspondant aux quantités de Suneem 1% ajoutées dans chaque bocal sont obtenues avec les formules suivantes :

Calcul de la quantité d'azadirachtine (Q_{AZ}) contenue dans une quantité X (ml) de Suneem 1%

$$Q_{AZ} \text{ (g)} = \frac{X \text{ (ml)} \times 10 \text{ (g) d'azadirachtine}}{1000 \text{ ml}}$$

Avec **X (ml)** : volume de Suneem prélevé ; **Q_{AZ}** : quantité d'azadirachtine contenue dans un volume prélevé ; **ml** : millilitres ; **Az** : azadirachtine.

Calcul de la concentration en azadirachtine C_{AZ} (g/l) dans chaque bocal :

$$C_{AZ} \text{ (g/l)} = \frac{Q_{AZ} \text{ (g) d'azadirachtine}}{500 \text{ ml d'eau distillée}}$$

Avec **C_{AZ}** : Concentration en azadirachtine ; **Q_{AZ}** : quantité d'azadirachtine contenue dans ce volume prélevé ;

Ces formules nous ont permis d'obtenir ces concentrations : $2 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 2mg/l), $4 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 4 mg/l) ; $6 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 6 mg/l) ; $8 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 8 mg/l) ; $10 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 10 mg/l), $12 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 12 mg/l) ; $14 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 14 mg/l) ; $16 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 16 mg/l) ; $18 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 18 mg/l) ; $20 \cdot 10^{-3}$ g/l (ou 20 mg/l)

B. Derniers stades (3 et 4) des larves de *Culex quinquefasciatus*

Le même protocole utilisé pour déterminer les mortalités ainsi que les doses létales 50 et 90 du Suneem 1% au niveau des stades jeunes a aussi été utilisé pour les stades âgés (stades 3 et 4) du moustique *Culex quinquefasciatus*.

III.2.2.2. Traitement des œufs de *Culex quinquefasciatus*

La sensibilité de l'espèce *Culex quinquefasciatus* est aussi évaluée en traitant les œufs par le Suneem 1%. Les concentrations entraînant une non-éclosion des œufs ou une éclosion anormale des œufs à 50% ou 90% sont déterminées (C_{ne} 50 et C_{ne} 90). Pour cela, 6 boîtes de Pétri ont été choisies plus une septième servant de témoin. Dans chaque boîte de pétri de 83cm^3 de volume,

nous avons versé 20 ml d'eau distillée puis immergé une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* ayant environ 250 à 350 œufs. Ensuite, nous avons ajouté dans chaque bocal successivement 0,01 ml, 0,02 ml, 0,03 ml, 0,04 ml, 0,05 ml, 0,06 ml. Dans la boîte de pétri-témoin, nous avons immergé une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* dans 20 ml d'eau distillée. Ces traitements sont faits dans les conditions de laboratoire à savoir une température comprise entre 25°C et 30°C, une Humidité Relative (H.R) d'environ 82% ± 10% et un taux de saturation de 75% ± 10. Les constats des taux bruts d'éclosion et de non-éclosion des œufs sont faits 24 heures et 48 heures après.

Lecture des bioessais

La lecture des bioessais s'est faite 24 heures et 48 heures après sa réalisation. Les larves sont nourries pendant les traitements afin d'éviter toute mortalité liée à un déficit en ressource alimentaire. Toutefois, la quantité de nourriture est réduite afin de ne pas favoriser la formation d'une voile bactérienne néfaste aux larves.

III.2.2.3. Traitement statistique des résultats

A. Correction des Taux Bruts de Mortalité (TBM)

Ces Taux Bruts de Mortalités (TBM) sont corrigés par rapport au taux de mortalité du témoin en utilisant la formule d'Abbot (Abbot, 1925) :

$$\text{Mortalité corrigée (\%)} = \frac{\text{Mortalité des moustiques} - \text{Mortalité des témoins}}{\text{Nombre total de moustiques} - \text{Mortalité des témoins}} \times 100$$

B. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée. Il s'agit de voir si les mortalités dues aux différentes concentrations sont significativement différentes. Cette analyse de variance des résultats est faite avec un niveau de significativité $\alpha = 0,01$ à l'aide de la rubrique « formule » dans Excel. Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives. Le test de Fisher est aussi effectuée c'est-à-dire la probabilité, pour une variable aléatoire continue, que les variances de la première matrice et celle de la deuxième matrice ne soient pas différentes de manière significatives. L'écart-type, la médiane, l'erreur type et l'intervalle de confiance sont aussi déterminées.

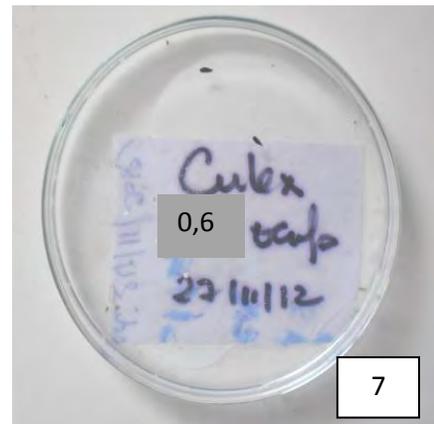
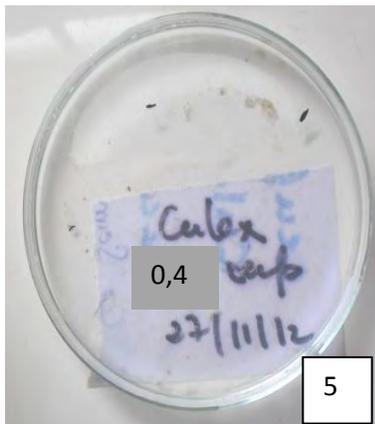
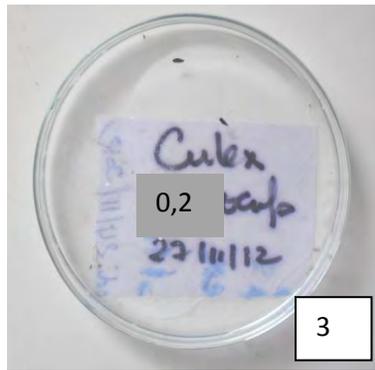
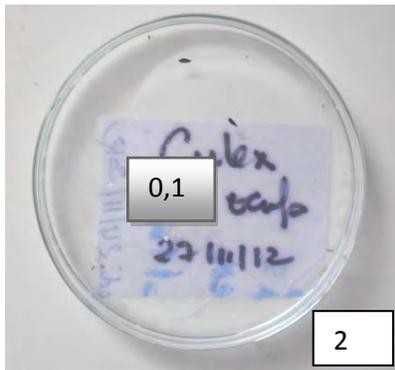


Figure 2 : Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,1ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°1.

Figure 3 : Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,2ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°2.

Figure 4 : Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,3ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°3.

Figure 5 : Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,4ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°4.

Figure 6 : Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,5ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°5.

Figure 7 : Traitement d'une barquette d'œufs de *Culex quinquefasciatus* avec une concentration de 0,6ml/20ml (Suneem/Eau distillée) dans la boîte de pétri n°6.

Figure 8 : Témoin : immersion d'une barquette de *Culex quinquefasciatus* dans de l'eau distillée



9



10



11 a



11 b

Figure 9: Traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* avec des concentrations croissantes de Suneem 1% dans des bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm (**série 1 à 6**).

Figure 10: Traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* avec des concentrations croissantes de Suneem 1% dans des bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm (**série 7 à 10**). Le douzième bocal constitue le témoin où les larves ne sont pas traitées et sont immergées dans de l'eau.

Figures 11a et 11b: Conditionnement des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées dans des cages de 30 cm² pour éviter toutes influences extérieures.

III.3 RESULTATS

III.3.1 Sensibilité du moustique *Culex quinquefasciatus* au stade œuf

A l'état œuf, le moustique *Culex quinquefasciatus* est sensible au Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss). Cette sensibilité est appréciée en termes du nombre d'œufs éclos et non-éclos, du taux d'éclosion ou de non-éclosion (en pourcentage) en fonction des concentrations et de la durée du traitement. Les résultats de cette sensibilité du *Culex quinquefasciatus* à l'état œuf sont donnés sous forme de tableaux valeurs (tableaux 1, 2 et 3).

Le tableau 1 montre les résultats de traitement d'une barquette d'environ 300 œufs de *Culex quinquefasciatus* avec le Suneem 1%.

Tableau 1 : Taux d'éclosion des œufs du moustique *Culex quinquefasciatus* en fonction de la concentration en Suneem 1% pour un traitement de 24 heures.

		Concentrations d'azadirachtine (10^{-3} mg/l)						
		10	20	30	40	50	60	Témoin
24 h	Nombre éclos	245	110	90	85	10	9	258
	Taux d'éclosion (%)	82	37	30	28	3	3	99
	Nombre non-éclos	55	190	210	215	290	291	2
	Taux de non-éclosion (%)	18	63	70	72	97	97	1

L'analyse du tableau 1 montre que, plus la concentration en azadirachtine contenue dans le Suneem 1% augmente, moins les œufs de *Culex quinquefasciatus* éclosent. Parallèlement, le nombre d'œufs non-éclos augmente. A la concentration de $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine, et dans les conditions expérimentales du laboratoire sus-énoncées dans la méthodologie, nous avons enregistré 245 œufs de *Culex quinquefasciatus* éclos sur un total de 300 de la barquette traitée soit un pourcentage d'éclosion de 82%. Cette concentration bloque très peu les œufs de *Culex quinquefasciatus* à l'éclosion. Par contre aux concentrations de $30 \cdot 10^{-3}$ et de $40 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine, nous avons enregistré 90 et 85 œufs de *Culex quinquefasciatus* éclos correspondant respectivement à des pourcentages d'éclosion de 30% et de 28%. Aux concentrations de $30 \cdot 10^{-3}$ et $40 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine, les taux d'éclosion des œufs sont significativement plus faibles comparés au taux d'éclosion à la concentration de $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l

($p < 0,05$). Aux concentrations $50 \cdot 10^{-3}$ et $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine, nous avons noté un taux d'éclosion très faible d'environ 3% des œufs de *Culex quinquefasciatus*. Le taux d'éclosion de 3% est significativement plus faible que ceux de 30% et de 28% ($p < 0,05$). C'est dire donc que les concentrations de $50 \cdot 10^{-3}$ et $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine contrôlent de manière efficace le moustique *Culex quinquefasciatus*. Dans le témoin, nous avons enregistré une éclosion de 258 œufs de *Culex quinquefasciatus* sur un total de 300. Nous n'avons noté que 2 œufs non-éclos sur un total 300 dans le témoin soit un pourcentage d'éclosion de presque 99%.

Tableau 2 : Taux d'éclosion des œufs de moustique *Culex quinquefasciatus* en fonction de la concentration en Suneem 1% après un traitement de **48 heures**.

		Concentrations d'azadirachtine (10^{-3} mg/l)						
		10	20	30	40	50	60	Témoin
48 h	Nombre éclos	202	88	87	75	60	5	249
	Taux d'éclosion (%)	81%	35	35	24	20	2%	100
	Nombre non éclos	48	162	163	175	190	245	1
	Taux de non éclosion (%)	19%	65	65	80	76	80%	1

Le **tableau 2** donne les variations du nombre d'œufs de *Culex quinquefasciatus* éclos, de celui des œufs non-éclos et du taux d'éclosion en fonction des concentrations en azadirachtine du Suneem 1% après 48 heures de traitement. A la plus petite concentration utilisée ($10 \cdot 10^{-3}$ mg/l), nous avons enregistré 202 œufs éclos sur un total de 250 de la barquette traitée soit un pourcentage d'éclosion de 81%. Cette concentration n'a empêché que très peu d'œufs de *Culex quinquefasciatus* d'éclore. C'est dire donc qu'à cette concentration $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l, nous disposons de peu de chance pour contrôler efficacement le *Culex quinquefasciatus* au stade œuf. Dans la gamme de concentrations comprise entre $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $40 \cdot 10^{-3}$ mg/l, nous avons enregistré respectivement 88, 87 et 75 œufs de *Culex quinquefasciatus* éclos. Ces valeurs correspondent respectivement à des taux d'éclosion de 35% et 24%. Le taux d'éclosion à 50% se situe dans la gamme de concentrations comprise entre $10 \cdot 10^{-3}$ et $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l correspondant à des taux d'éclosions situés entre 81% et 31%. La plus grande concentration ($60 \cdot 10^{-3}$ mg/l) a entraîné un taux d'éclosion très faible de 2%. Ce taux d'éclosion est significativement plus faible ($p < 0,05$)

faible à ceux à $10 \cdot 10^{-3}$ et $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l. Donc la concentration de $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine contrôle efficacement le *Culex quinquefasciatus* à stade œuf.

Tableau 3 : Pourcentage d'éclosion des œufs de *Culex quinquefasciatus* en fonction de la concentration en Suneem 1% après **72 heures**.

		Concentrations d'azadirachtine (10^{-3} mg/l)						
		10	20	30	40	50	60	Témoin
72h	Nombre éclos	190	180	120	99	90	4	247
	Taux d'éclosion (%)	98	72	47	39	35	1	99
	Nombre non éclos	60	70	130	151	160	246	3
	Taux de non éclosion (%)	10	28	53	61	65	99	1

Le tableau 3 donne les variations du nombre d'œufs de *Culex quinquefasciatus* éclos, de celui non-éclos, des pourcentages d'éclosion et de non-éclosion en fonction des concentrations en azadirachtine du Suneem 1% après une durée de traitement de 72 heures. A la concentration de $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine nous avons obtenu, après 48 heures de traitement, 190 œufs de *Culex quinquefasciatus* éclos sur un total de 250 traités soit un pourcentage d'éclosion de 98%. Parallèlement, 60 œufs de *Culex quinquefasciatus* sont restés intacts et n'ont pas subi d'éclosion. Leur éclosion semble être bloquée par les effets de l'azadirachtine. Un taux d'éclosion des œufs de *Culex quinquefasciatus* à 50% se situe dans la gamme de concentrations entre $20 \cdot 10^{-3}$ et $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l correspondant respectivement à 72% et 47%. La concentration la plus forte utilisée dans cette étude ($60 \cdot 10^{-3}$ mg/l) a donné un taux d'éclosion très faible de 1%. Cette concentration de $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine contrôle bien le *Culex quinquefasciatus* au stade œuf pendant une période de 72 heures. L'analyse du tableau 3 montre aussi que le taux d'éclosion des œufs de *Culex quinquefasciatus* diminue significativement au moment où la concentration en azadirachtine augmente ($p < 0,05$). Au niveau du témoin le pourcentage d'éclosion est de 99%.

III.3.2 Sensibilité du moustique *Culex quinquefasciatus* au stade larvaire

A. Sensibilité des larves de stades 1 et 2

Le tableau 4 ci-dessous représente les mortalités brutes, cumulées et corrigées des larves de stade 1 et 2 de *Culex quinquefasciatus* en fonction des concentrations en azadirachtine du Suneem 1% après 24 heures de traitement.

Tableau 4: Mortalités des larves de stades L1 et L2 de *Culex quinquefasciatus* en fonction des concentrations en Suneem 1% après 24 heures de traitement.

		Concentrations d'azadirachtine (mg/l)										
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	Témoin
24 h	Mortalités brutes	12	28	31	35	47	50	57	60	90	97	4
	Mortalités corrigées (%)	8%	25	28	32	45	50	55	58	90	99	4%

Le tableau 4 montre une augmentation de la mortalité des larves de stades 1 et 2 de *Culex quinquefasciatus*. Cette mortalité augmente significativement en fonction de la concentration en azadirachtine ($P < 0,05$). La mortalité la plus faible a été obtenue à la concentration de 2 mg/l d'azadirachtine. Cette mortalité s'élève à 12 larves mortes de stades 1 et 2 soit un pourcentage de mortalité de 8%. Une mortalité à 50% des larves (stades L1 et L2) de *Culex quinquefasciatus* a été obtenue à 12 mg/l d'azadirachtine. Cette concentration représente la dose létale 50 (CL 50). Une mortalité à 90% des larves de *Culex quinquefasciatus* a été obtenue à 18 mg/l. Cette concentration représente la dose létale 90 (CL 90). Une mortalité de presque 100% a été obtenue à 20 mg/l d'azadirachtine. Les mortalités obtenues aux différentes concentrations sont significativement supérieures à celle du témoin qui est de 4% ($p < 0,05$).

Le tableau 5 ci-dessous représente les mortalités des larves de stades jeunes (L1 et L2) de *Culex quinquefasciatus* près 48 heures de traitement au Suneem 1%.

Tableau 5 : Mortalités des larves de stades jeunes (L1 et L2) de *Culex quinquefasciatus* en fonction des concentrations en Suneem 1% après **48 heures** de traitement.

		Concentrations d'azadirachtine (mg/l)										
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	Témoin
48h	Mortalités brutes	18	42	46	48	67	87	90	98	98	100	5
	Mortalités corrigées (%)	14%	39	43	45	65	86	90	98	98	100	5%

Ces mortalités augmentent avec les concentrations en azadirachtine du Suneem 1%. La mortalité la plus faible a été obtenue à 2 mg/l avec 18 larves mortes correspondant à un pourcentage de mortalité de 14%. Une mortalité à 50% des larves (stades L1 et L2) de *Culex quinquefasciatus* après les 48 heures de traitement se situe entre les concentrations létales 8 et 10 mg/l. Ces concentrations ont donné des mortalités respectives de 45% et de 65%. Une mortalité à 90% a été obtenue à 14 mg/l. Cette concentration représente la dose létale 90 (CL 90). Les larves de *Culex quinquefasciatus* traitées meurent totalement (100%) à 20 mg/l. Une mortalité de 5% a été obtenue au niveau du témoin.

L'analyse statistique montre que la mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus*, après 48 heures de traitement au Suneem, est plus significative ($p < 0,05$) que celle des larves de *Culex quinquefasciatus* après un traitement de 24 heures. C'est dire que la durée de traitement joue un rôle important dans l'efficacité du Suneem 1% sur les larves de stades jeunes du *Culex quinquefasciatus*.

Analyses statistique

Tous ces pourcentages de mortalités sont à considérer avec une erreur-type de 7%. L'analyse de la variance montre un effet larvicide significatif ($p < 0,01$) des différentes concentrations en azadirachtine au Suneem 1%. En comparant les mortalités des différentes concentrations utilisées, on note un niveau de significativité faible ($p = 0,01$). Autrement dit, les mortalités des larves de *Culex quinquefasciatus* ne sont pas significativement différentes en allant d'une concentration à une autre mais aussi d'une durée de traitement à une autre ($p < 0,05$).

L'intervalle de confiance (IC) ainsi que l'erreur-type de ces résultats sont respectivement de 4,89 et de 7,6.

B. Sensibilité des larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus*

Le tableau 6 ci-dessous représente les taux de mortalités des larves de stades 3 et 4 après 24 heures de traitement avec le Suneem 1%.

Tableau 6: Mortalité des larves de stades âgés (stades 3 et 4) de *Culex quinquefasciatus* après un traitement de **24 heures** avec le Suneem 1%

Concentrations d'azadirachtine (mg/l)												
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	Témoin
24 H	Mortalités brutes	21	24	27	28	23	30	34	35	41	41	2
	Mortalités Corrigées (%)	19%	23	26	29	30	31	32	33	40	40	2%

Les résultats de ce tableau 6 montrent une augmentation de la mortalité des larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus* en fonction de la concentration en azadirachtine. La mortalité la plus faible a été notée à 2 mg/l avec 21 larves mortes correspondant à un pourcentage de mortalité de 19%. Une mortalité à 50% des larves (stades L3 et L4) de *Culex quinquefasciatus* n'a pas été obtenue même avec la concentration la plus forte de 20 mg/l. La concentration de 20 mg/l d'azadirachtine a donné une mortalité de 40%. Donc pour atteindre les 50% de mortalité des larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus*, il faut une concentration supérieure à 20 mg/l. Une mortalité de 2% des larves (stades L3 et L4) de *Culex quinquefasciatus* a été obtenue au niveau du témoin.

Le tableau 7 ci-dessous représente les taux de mortalités des larves de stades âgées (L3 et L4) après 48 heures de traitement avec le Suneem 1%.

Tableau 7: Mortalités des larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus* après un traitement de **48 heures** vec le Suneem 1%.

		Concentrations (mg/l)										
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	Témoin
48h	Mortalités brutes	43	45	46	46	47	49	50	50	50	50	3
	mortalités corrigées	41	43	44	44	45	47	48	48	48	48	3%

Les résultats de ce tableau 7 montrent une mortalité des larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus* qui augmentent significativement en fonction de la concentration en azadirachtine ($P < 0,05$). Les concentrations allant de 14 mg/l à 20 mg/l d'azadirachtine ont donné un pourcentage de mortalité d'environ de 50%. Ces concentrations représentent les CL50. Une mortalité de 3% des larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus* a été obtenue au niveau du témoin. Les mortalités obtenues aux différentes concentrations sont significativement supérieures à celle du témoin qui est de 3% ($p < 0,05$).

III.4. DISCUSSION

Les biopesticides à base de neem sont efficaces dans la lutte contre les moustiques comparés aux insecticides chimiques de synthèse (Jang et al., 2002 ; Cavalcanti et al., 2004). Des études comme celui de Al-Shorook et al., (1991) ont permis d'affirmer que ces biopesticides sont respectueux de l'environnement et non toxiques sur les vertébrés.

Dans cette étude, le Suneem 1% a entraîné au niveau des larves de *Culex quinquefasciatus* les mortalités suivantes :

espèces	temps	n	LC ₅₀	LC ₉₀	RR ₅₀	RR ₉₀
<i>Cx quinquefasciatus</i> (larves de stades 1 and 2)	24 h	100	12 mg/l	18 mg/l	1,33	2
	48 h	100	9 mg/l	14 mg/l	1	1,55
<i>Cx quinquefasciatus</i> (larves de stades 3 and 4)	24 h	100	> 20 mg/l	> 20 mg/l	1,44	1
	48 h	100	14 mg/l	> 20 mg/l	1	1

n: nombre total de larves de *Culex quinquefasciatus* traitées **RR:** est le rapport entre le ratio des larves sensibles sur le ratio des larves insensibles (ou résistant) au Suneem1%.

Le traitement des œufs avec le Suneem 1% a donné les résultats. En effet, après 24 heures de traitement, la concentration qui a donné 50% comme taux d'éclosion se situe entre $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l. Ces résultats sont similaires pour un traitement pendant 48 heures. Un taux d'éclosion à 90% n'a pas été obtenu. Après 72 heures de traitement, la concentration qui a donné un taux d'éclosion de 50% se situe entre $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l. Celle qui a donné un taux d'éclosion de 90% est de $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l.

Les chercheurs Dua et al. (2009) traitant les moustiques (*Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* et *Aedes aegypti*) avec de l'huile de neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) ont trouvé un pourcentage de réduction (ou de mortalité) des larves de *Culex* de 95,5% pendant 24 heures (1 jour) et de 100% pendant une semaine et plus pour une concentration de 140 mg/l. Dans notre étude, les concentrations létales de Suneem 1% qui ont donné 100% de larves de *Culex quinquefasciatus* mortes sont obtenues à 20 mg/l après 24 heures et à 18 mg/l après 48 heures. Ces résultats démontrent que le Suneem 1% utilisée dans cette étude est plus efficace que l'huile de neem utilisée par Dua et al. (2009) contre les larves de genre *Culex*. Cette différence pourrait être expliquée par une différence dans la composition des deux biopesticides mais aussi par la tolérance du *Culex quinquefasciatus*.

Dua et al. (2009) ont trouvé 50% de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* à une concentration létale 50 (CL 50) de 1,8 ppm d'azadirachtine de l'huile de neem. Dans cette étude, nous avons obtenu une CL50 de 12 mg/l après 24 heures et entre 8 et 10 mg/l après 48 heures.

L'huile de neem utilisée pour traiter les larves de *Culex quinquefasciatus* montre une CL50 plus faible que la CL50 trouvée avec le Suneem 1%. C'est dire que l'huile de neem utilisée par Dua et al. est plus toxique et a une efficacité plus nette sur les larves de *Culex quinquefasciatus* que le Suneem 1% utilisée dans notre étude. Cette différence peut être expliquée par une composition différente des deux biopesticides, par une tolérance différente du *Culex quinquefasciatus* car les larves traitées ne viennent pas d'un même cadre géographique. Par ailleurs, Vatandoost et Vaziri (2004) traitant les larves de *Culex quinquefasciatus* ont trouvé une CL 50 de 0,69 mg/l et CL 90 de 3,18 mg/l. Dans notre étude, le traitement des larves de stade 1 et 2 par le Suneem (azadirachtine) a donné une CL50 et CL90 respectives de 12 et 18 mg/l après 24 heures et de 9 et 14 mg/l après 48 heures. Nous constatons que les CL50 et CL90 trouvées après 24 heures et 48

heures dans cette étude sont significativement plus élevées que celles de Vatandoost et Vaziri. Le Neemarin (extrait d'azadirachtine) utilisé par Vatandoost et Vaziri est plus efficace que le Suneem.

Sharma et al. (2009) traitant les larves de *Culex quinquefasciatus* avec des extraits méthanoliques d'*Azadirachta indica* a donné des LC (50) de 21,95 et 11,30 ppm après 24h et 48h d'exposition respectivement. Dans notre étude, le traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* avec le Suneem 1% a donné des CL 50 de l'ordre de 12 mg/l et 9 mg/l après 24 et 48 heures respectivement. Nous ne constatons que les CL50 trouvées après 24 heures et 48 heures par Sharma et al. (2009) sont plus fortes que celles trouvées dans cette étude. C'est dire que le Suneem est plus efficace que les extraits méthanoliques d'*Azadirachta indica* utilisés par Sharma et al. (2009). Ces résultats s'expliquent par une différence dans la composition des deux biopesticides et dans la tolérance du *C. quinquefasciatus*.

Batabyal et al. (2009) ont trouvé des CL50 de 74,04 et 58,52 ppm et des CL90 de 201,83 et 171,70 ppm en traitant des larves de *Culex quinquefasciatus* avec des extraits méthanoliques d'*Azadirachta indica*. En comparant ces résultats avec les CL50 et CL90 trouvées on peut affirmer sans risque de se tromper que le Suneem 1% utilisée dans cette étude est plus efficace que les extraits méthanoliques d'*A. indica* utilisés par Batabyal et al. (2009).

Sharma et al. (2009) ont trouvé en traitant les œufs avec des extraits de neem :

- l'éclosion des œufs de *Culex quinquefasciatus* est retardée voire même stoppée,
- les taux d'éclosion des œufs est réduit comparé au témoin,
- Le développement des larves et pupes a été arrêté entraînant une diminution de transformation chrysalide et l'émergence des adultes,
- Les périodes de développement des larves et les pupes ont été prolongés avec apparition d'intermédiaires larves-pupes et pupes-chrysalides et chrysalides-adulte, avec une augmentation globale de la période de développement,
- la surface du corps des larves est déchitinisée.

Dans cette étude, nous avons observé presque les mêmes résultats en traitant les œufs de *Culex quinquefasciatus* avec le Suneem 1%.

III.5. CONCLUSION

Cette étude menée dans ce chapitre III nous a permis de déterminer la sensibilité nette du *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%. Cette sensibilité augmente significativement au fur et à mesure que les concentrations en Suneem 1% augmentent. Des concentrations létales 50 (CL50) et 90 (CL90) ont été obtenues. Ces résultats permettent une fois de plus de dire que le Suneem 1% pourrait valablement constituer une alternative aux insecticides chimiques de synthèse tels que le DDT (Diphenyl Dichloro Tetracycline hexane), la deltaméthrine etc.

Cependant, il y a lieu de noter que quelques larves ont échappé à l'effet toxique du Suneem 1%. Ces larves ont probablement développé un système interne qui leur a permis de résister aux concentrations létales du Suneem 1%.

CHAPITRE IV

ETUDE DES EFFETS HISTOPATHOLOGIQUES DU SUNEEM 1% SUR LES LARVES DE *CULEX* *QUINQUEFASCIATUS*

IV.1 INTRODUCTION

Dans les pays d'Afrique comme le Sénégal, l'utilisation des pesticides chimiques (exemples: le fénitrothion, la deltaméthrine, les carbamates etc.) dans la lutte contre les vecteurs de maladies (les moustiques) constitue un sérieux problème. En effet, les coûts relativement élevés des pesticides chimiques, les résistances des moustiques (larves et adultes) et les pollutions chimiques du sol, des eaux douces et de l'air constituent un frein à leur utilisation. En plus de cela, la majorité des intoxications sont provoquées par les pesticides chimiques. L'utilisation de produits naturels comme le neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) constitue une alternative à la lutte contre les moustiques surtout contre les espèces du genre *Culex* qui sont des moustiques très prépondérants en milieu urbain et péri-urbain. Des travaux scientifiques portant sur divers produits naturels à potentiel insecticide ont été menés en Afrique et dans le monde. Certains de ces travaux ont porté sur les effets histopathologiques des biopesticides sur les moustiques. Parmi ces études, nous pouvons citer les travaux de De Barjac (1978), de Charles et Huguette De Barjac (1981), de Karch et Coz (1983), de Huguette De Barjac (1987), de Syafruddin *et al.* (1990), de Koua (1994), de Rey *et al.* (1998), de Lina Maria Ruiz *et al.* (2004), de Al-Mehmadi et Al-Khalaf (2010), de Subarani *et al.*, (2012). Tous ces travaux scientifiques ont globalement montré des destructions cellulaires et tissulaires nettes en microscopies photonique et/ou électronique. Des études scientifiques portant sur les effets histopathologiques des produits de neem ont été réalisées en Afrique et particulièrement au Sénégal. Mais ces études sont peu nombreuses. Parmi celles-ci nous pouvons citer les travaux de Ndione *et al.* (2004), de Sèye (2004), de Ndione *et al.*, (2006), Sèye (2006), de Sèye *et al.*, (2006 a), de Sèye *et al.*, (2006 b), de Ndione *et al.* (2007), Ndione *et al.* (2014). C'est dans cette dynamique que s'inscrit notre étude contribue à montrer les effets cytopathologiques et histopathologiques du Suneem 1% en microscopies photonique et électronique.

IV.2. MATERIEL

L'espèce utilisée dans ce travail est le *Culex quinquefasciatus*. Elle a été obtenue et cultivée suivant la même procédure que celle décrite dans le chapitre III.

IV.3 METHODE

IV.3.1 Microscopie électronique à transmission

Fixation : Les larves de stades 3 et/ou 4 de *Culex quinquefasciatus*, affectées par l'azadirachtine et non mortes pendant leur traitement et celles non traitées (témoins), sont découpées en petits

morceaux et fixées au glutaraldéhyde 2,5% pendant 72 heures à la température de 4°C au réfrigérateur.



Figure 12: fixation des larves de *Culex quinquefasciatus* dans du glutaraldéhyde 2,5%.

Rinçage : afin d'éliminer les traces de glutaraldéhyde 2,5%, les morceaux de larves de stades 3 et/ou 4 de *Culex quinquefasciatus* sont lavés dans un mélange de PBS (Phosphate Buffered Saline) et d'eau distillée (1:1). Ce lavage s'est fait pendant 15 min.

Post-fixation : est faite dans un mélange d'acide osmique (ou osmium) 1% et de PBS (Phosphate Buffered Saline) au réfrigérateur à 4°C pendant 1 heure. Cette solution est un mélange moitié-moitié (1:1).

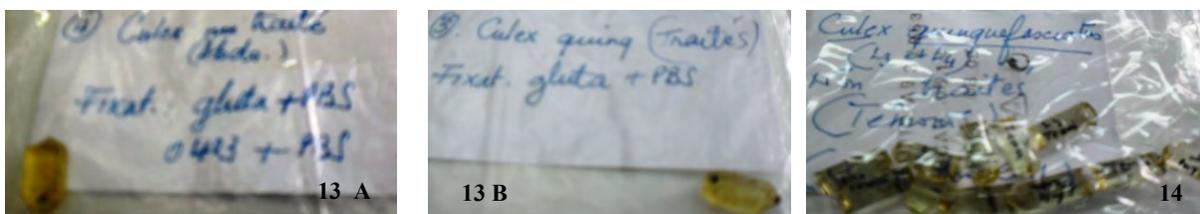
Déshydratation : est faite par un passage des morceaux de larves de stades 3 et 4 de *Culex quinquefasciatus* dans des bains d'acétone de degrés croissants 30%, 70% et 95% chacune d'une durée de 30 minutes. Cette déshydratation a été achevée par 2 bains d'acétone absolue 100% d'une durée aussi de 30 minutes.

L'Imprégnation : est faite dans des bains d'une solution de résine pure mélangée à l'acétone dans les proportions et temps de séjours suivants : 1/3 résine pure + 2/3 acétone : 1 heure ; 1/2 résine pure + 1/2 acétone : 1 heure ; 2/3 résine pure + 1/3 acétone : 1 heure. Après cette dernière étape, nous avons laissé les morceaux de larves séjourner pendant toute une nuit (10 heures environ) dans la résine pure.

Inclusion : est réalisée avec des moules à inclusion où l'on a déposé les morceaux de larves dans la résine. La résine avec les morceaux de larves de *Culex quinquefasciatus* est polymérisée dans une étuve réglée à 60°C pendant 48 heures à 72 heures avant la taille.

Obtention des blocs: Après déroulement du protocole deux types de blocs sont obtenus :

- des échantillons de larves de *Culex quinquefasciatus* non traitées ou témoins,
- des échantillons de larves de *Culex quinquefasciatus* traitées avec le Suneem 1%.



Figures 13 A et 13 B: Echantillons des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées au Suneem dans des blocs d'épon pour la coupe en microscopie électronique à transmission (MET). Ces blocs ont été réalisés à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal).

Figure 14 : Echantillons des larves de *Culex quinquefasciatus* non traitées (témoins) réalisés pour la coupe en MET à l'Université Alexandru Ioan Cuza de Iasi en Roumanie.

Taille des blocs : Nous avons taillé une pyramide portant à son sommet un morceau de larves de *Culex quinquefasciatus* traitée ou non traitée (témoin) par le Suneem 1%. La taille est faite avec un cutter bien aiguisé.

Coupe : Les blocs taillés sont coupés à l'aide d'un ultra-microtome automatique de marque « Ultracut E ». Deux types de coupes ont été réalisés : des coupes semi-fines et ultrafines.

Coupes semi-fines : d'une épaisseur de 0,1 μm à 0,99 μm , elles sont recueillies dans le godet du couteau contenant de l'eau distillée. Puis les coupes sont ramassées grâce à des comètes (anneau de Marinozzi) puis étalées sur des lames porte-objet. Ces lames sont placées sur une plaque chauffante afin de faire évaporer l'eau.

Les coupes ultrafines : d'une épaisseur de 0,1 nm à 0,99 nm, les coupes ultra-fines sont rassemblées et directement recueillies sur une grille pour observation avec le Microscopie Électronique à Transmission (MET).

Coloration : Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de méthylène ou de toluidine. Celles ultrafines sont traitées à l'acétate d'uranyle à 2,5 % pendant 30 minutes à l'obscurité, ensuite à l'acétate de plomb 1% pendant 1mn pour améliorer le contraste.

Observation et prise de photos : les coupes semi-fines sont observées avec le microscope photonique de marque « motic » relié à un micro-ordinateur. Les images sont prises en format « JPEG ». Celles ultrafines sont observées et photographiées au Microscope Électronique à Transmission (MET) de marque PHILIPS.

IV. 4. RESULTATS

IV. 4.1. effets pathologiques du Suneem 1% sur *Culex quinquefasciatus*

L'analyse des effets pathologiques du Suneem sur les larves de *Culex quinquefasciatus* est réalisée à la suite de l'observation des photos des larves témoins et traitées. Ces effets pathologiques du Suneem sont décrits au niveau de l'abdomen des larves de *Culex quinquefasciatus*.

A. En microscopie photonique

A.1. Les témoins

La figure 15 montre une larve témoin de *Culex quinquefasciatus* avec des cellules intactes. Ces cellules présentent un noyau ovoïde baignant dans un cytoplasme homogène. Elles sont limitées par une membrane et reposent sur une lame basale. Au niveau de leur partie apicale, ces cellules montrent une bordure en brosse très développée. La figure 16 montre aussi des cellules épithéliales normales. Elles présentent des cellules avec une largeur d'environ 10 µm et une hauteur de 8,3 µm avec des noyaux arrondis et centraux. Ces cellules présentent au niveau de leur pôle apical des microvillosités ou bordure en brosse très développée. Ces cellules reposent sur une lame basale. La colonne alimentaire est présente. L'épithélium est protégé par la présence de la membrane péritrophique. La photo 16 montre des tissus adipeux et musculaire intacts comme au niveau de la photo 14.

A.2. Larves traitées

La photo 17 montre l'intestin antérieur d'une larve de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%. Nous observons un épithélium rompu avec des espacements entre les cellules épithéliales. La photo 17 montre aussi des cellules épithéliales hypertrophiées. Certaines d'entre elles éclatent et libèrent leur contenu cytoplasmique dans la colonne alimentaire. La membrane péritrophique est détruite. L'analyse de la photo 18 des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées avec le Suneem 1% montre des cellules épithéliales hypertrophiées. Ces cellules présentent des excroissances au niveau de la partie apicale. Le tissu musculaire est atteint. La colonne alimentaire est bien présente et est non désorganisée.

Par contre la photo 19 montre des cellules épithéliales désorganisées dans leur structure et leur contenu. Au niveau apical, les cellules sont détruites et présentent des résidus entre la colonne alimentaire et l'épithélium.

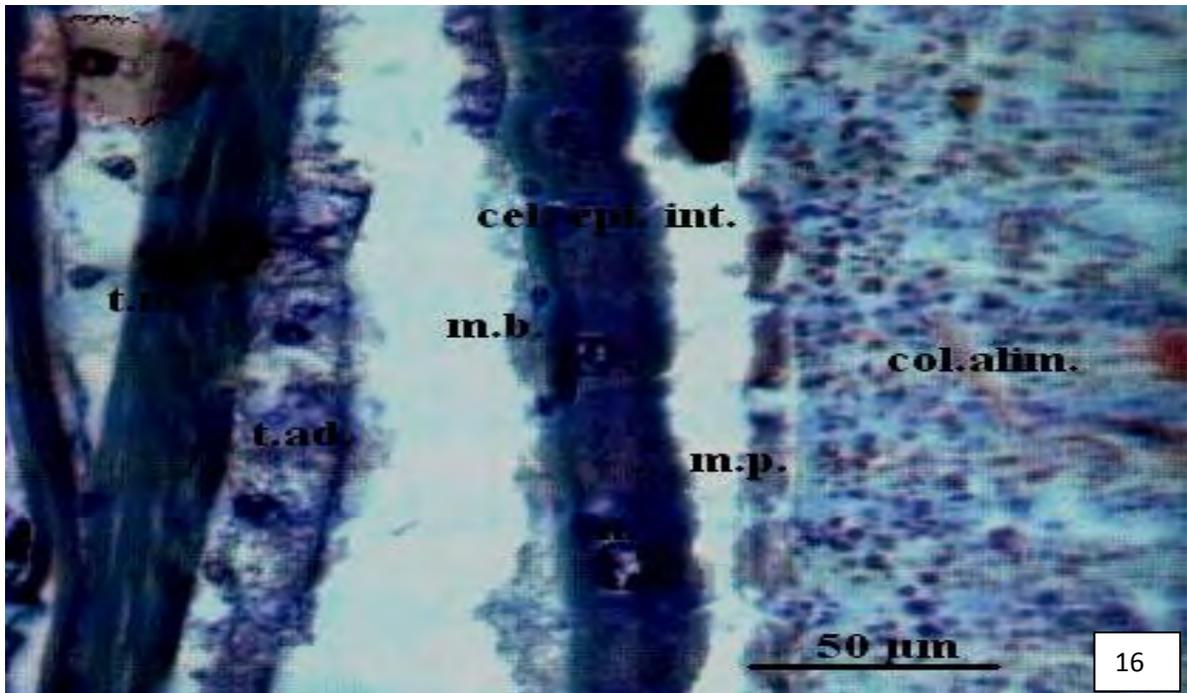
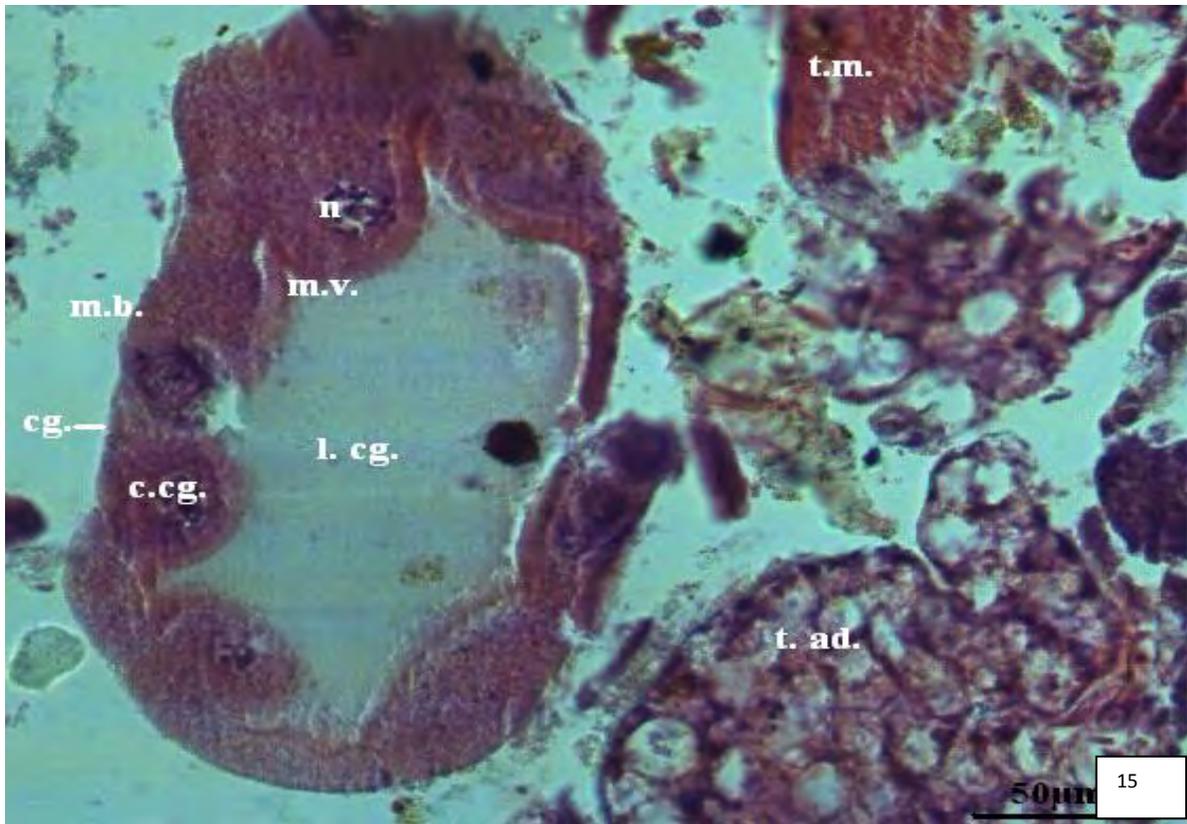
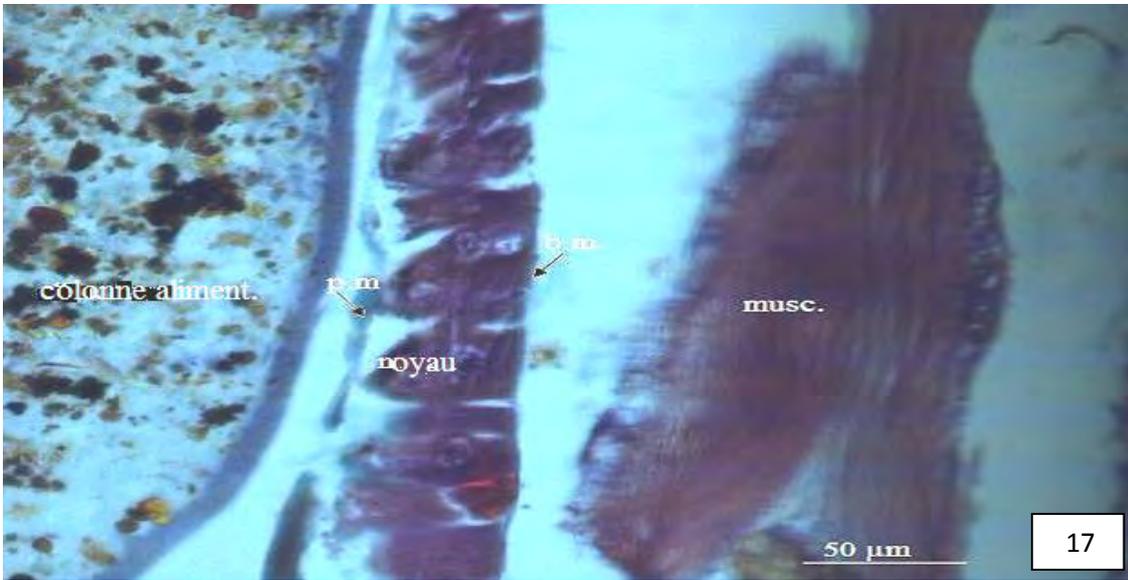


Figure 15: Coupe longitudinale du caecum gastrique d'une larve témoin de *C. quinquefasciatus* (non traitée au Suneem 1%).

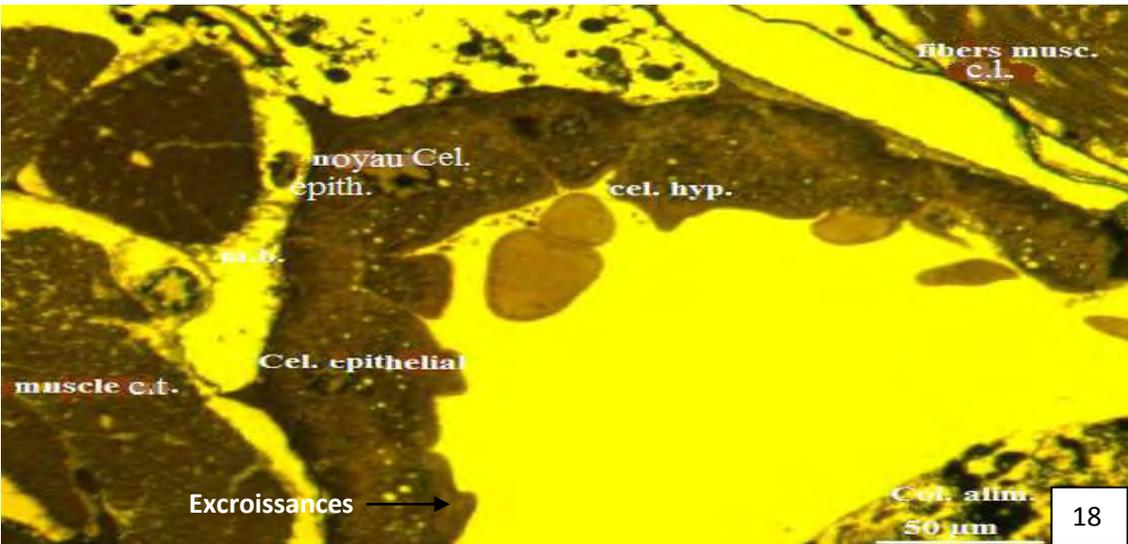
Abbreviations : m.b., membrane basale ; n., noyau ; mv., microvillosités ; cg., caecum gastrique ; c.cg., : Cellule du caecum gastrique ; l.cg., lumière du caecum gastrique ; t.a., tissu adipeux.

Figure 16: Coupe longitudinale au niveau de l'intestin moyen d'une larve témoin de *C. quinquefasciatus* (non traitée au Suneem 1%).

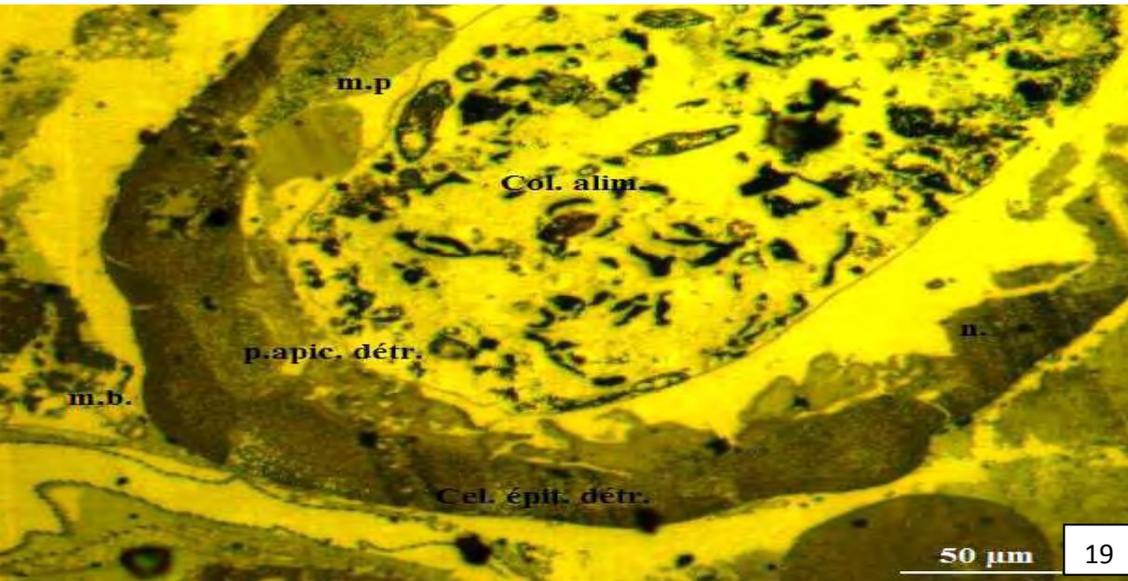
Abbreviations : cel. épit. int. : cellule épithéliale intestinale ; col.alim : colonne alimentaire ; m.p. : membrane péritrophique ; m.b. : membrane basale ; t.m. : tissu musculaire.



17



18



19

Figure 17: Coupe longitudinale de l'intestin antérieur d'une larve de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%.

Abbreviations : t.musc. : Tissu musculaire ; cel.hyper. : Cellules hypertrophiées ; épith.rompu : épithélium rompu ; C. détr. : Cellules détruites ; m.p.détr. : Membrane péritrophique détruite, colonne aliment. : Colonne alimentaire.

Figure 18: Coupe longitudinale de l'intestin postérieur d'une larve de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%.

Abbreviations : fibres musc.c.l. : Fibres musculaires en coupe longitudinale ; cel.hyp. : Cellule hypertrophiées ; cel. Épithéliale : cellule épithéliale ; muscle ; c.t. muscle coupe transversale ; col.alimen. : Colonne alimentaire ; m.b. membrane basale.

Figure 19: Coupe longitudinale de l'intestin postérieur d'une larve de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%.

Abbreviations : m.p: membrane péritrophique ; col. Alim. : Colonne alimentaire ; p. apic.détr. : Pôle apical détruit ; m.b. membrane basale ; cel.épit.détr. : Cellule épithéliale détruite.

B.En microscopie électronique

B.1.Témoins

La figure 20 présente une portion d'une cellule épithéliale intestinale d'une larve de *Culex quinquefasciatus* témoin (non traitée par le Suneem 1%). Cette photo 20 montre une cellule normale avec une chromatine présentant deux formes : des masses denses périphériques (hétérochromatine) et des parties claires (euchromatine). L'enveloppe nucléaire est intacte avec deux membranes distinctes. Le réticulum endoplasmique granulaire est dense et baigne dans le cytoplasme. En outre, les figures 21 et 23 montrent une portion de la cuticule d'une larve témoin de *Culex quinquefasciatus*. On observe une cuticule intacte organisée en trois couches bien distinctes : l'épicuticule, l'endocuticule et l'exocuticule. La figure 22 montre un tissu musculaire intact d'une larve témoin de *Culex quinquefasciatus*. Les fibres musculaires sont emballées dans un tissu conjonctif dense : l'épimysium.

B.2.Traitées

La photo 27 montre une coupe passant au niveau de deux cellules épithéliales de l'intestin moyen d'une larve de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%. Les photos 24 et 27 montrent des cellules complètement nécrosées et totalement désorganisées avec des noyaux presque vidés de leur chromatine. Dans la même dynamique, la cuticule n'est pas en reste et est aussi très atteinte par les effets de l'azadirachtine (figure 25). Les débris cuticulaires sont entassés dans l'estomac de la larve. La figure 26 montre une coupe du tissu musculaire d'une larve de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%. Cette photo 26 montre un tissu musculaire désorganisé avec des fibres musculaires détruites laissant des vides occupés par du tissu conjonctif. La photo 28 montre des cellules nécrosées.

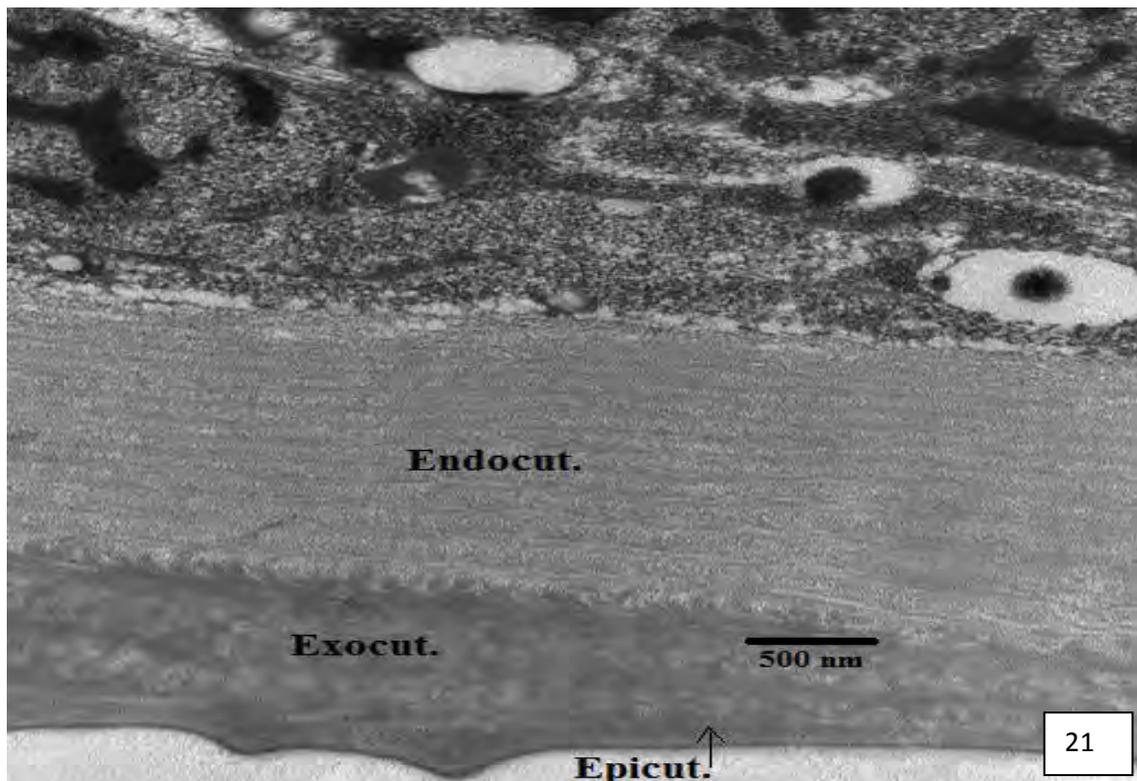
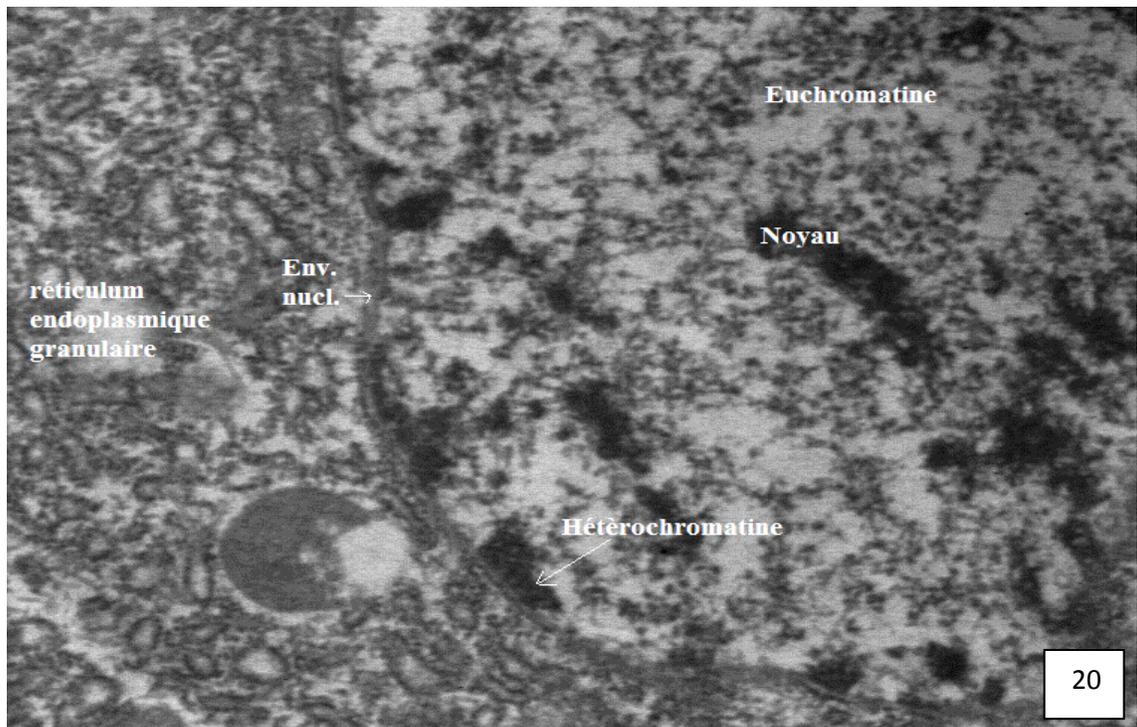


Figure 20: Utrastructure d'une portion d'une cellule épithéliale de l'intestin moyen d'une larve de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* **témoin** (larve non traitée avec le Suneem 1%). Cette photo montre un noyau normal.

Abbréviations: Env. nucl.= Enveloppe nucléaire

Figure 21: Utrastructure d'une partie de la cuticule d'une larve de *Culex quinquefasciatus* témoin (non traitée avec le Suneem 1%).

Abbréviations: Endocut.:endocuticule; Exocut.: exocuticule; Epicut.: épicuticule.

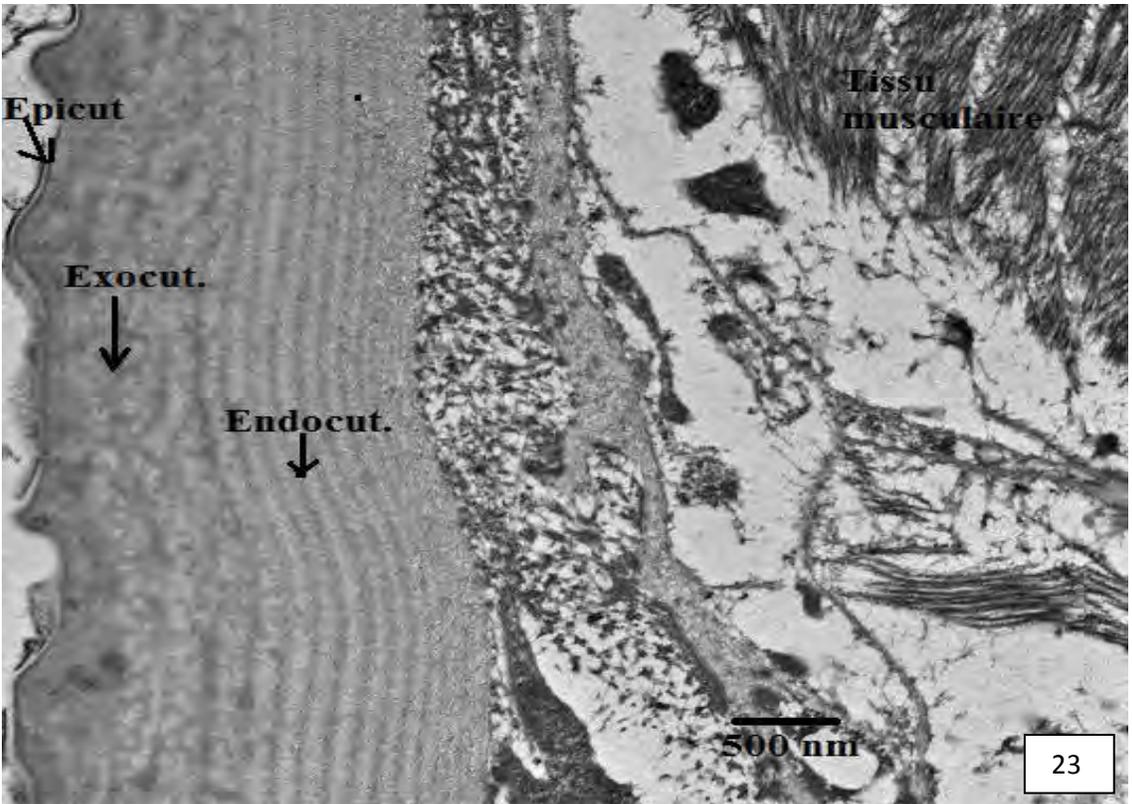
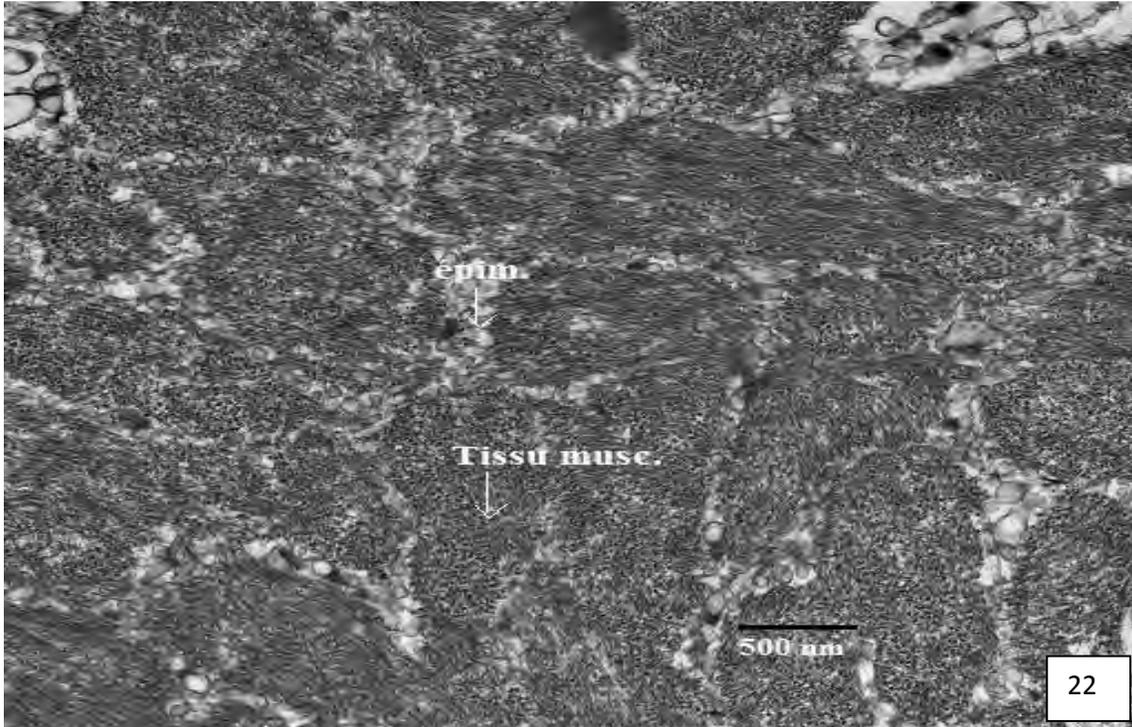


Figure 22: Utrastructure d'une coupe d'une larve **témoin** de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* (larve non traitée avec le Suneem 1%) passant au niveau du tissu musculaire. Cette photo montre un tissu musculaire normal.

Abbréviations: Epim.: épimysium; tissu musc.: tissu musculaire.

Figure 23: Utrastructure d'une coupe d'une larve **témoin** de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* (larve non traitée avec le Suneem 1%) passant surtout au niveau de la cuticule.

Abbréviations: Epicut.: épicuticule, Exocut.:exocuticule, Endocut.: endocuticule.

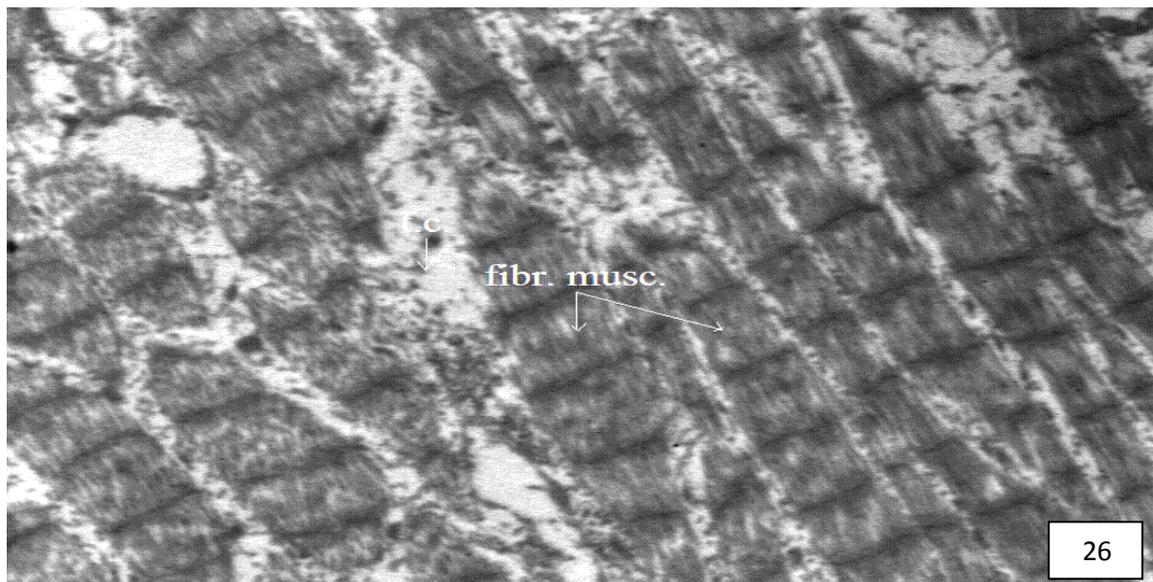
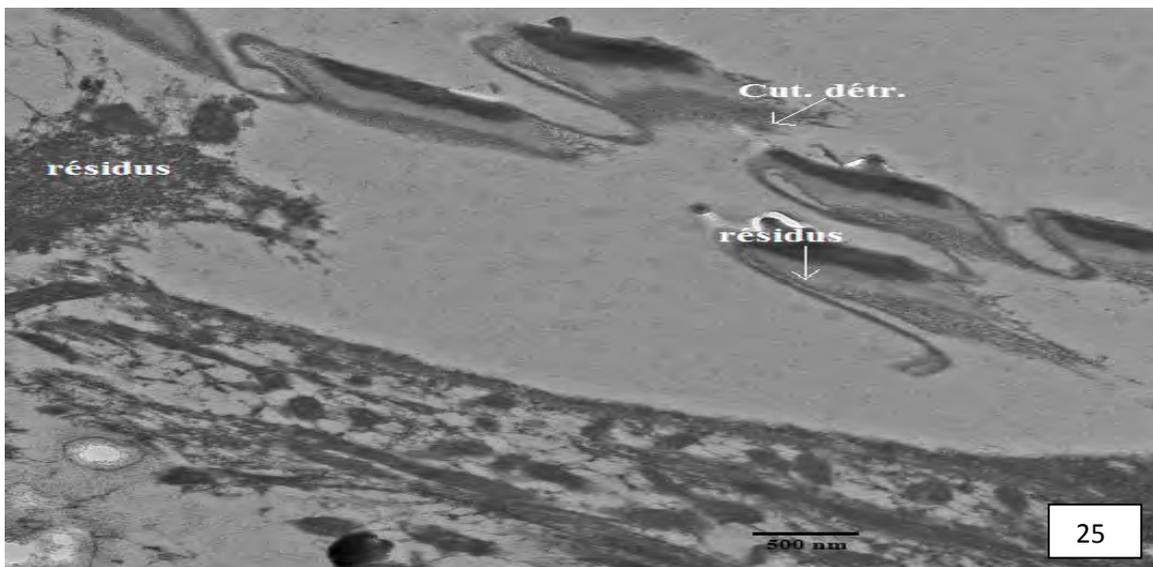
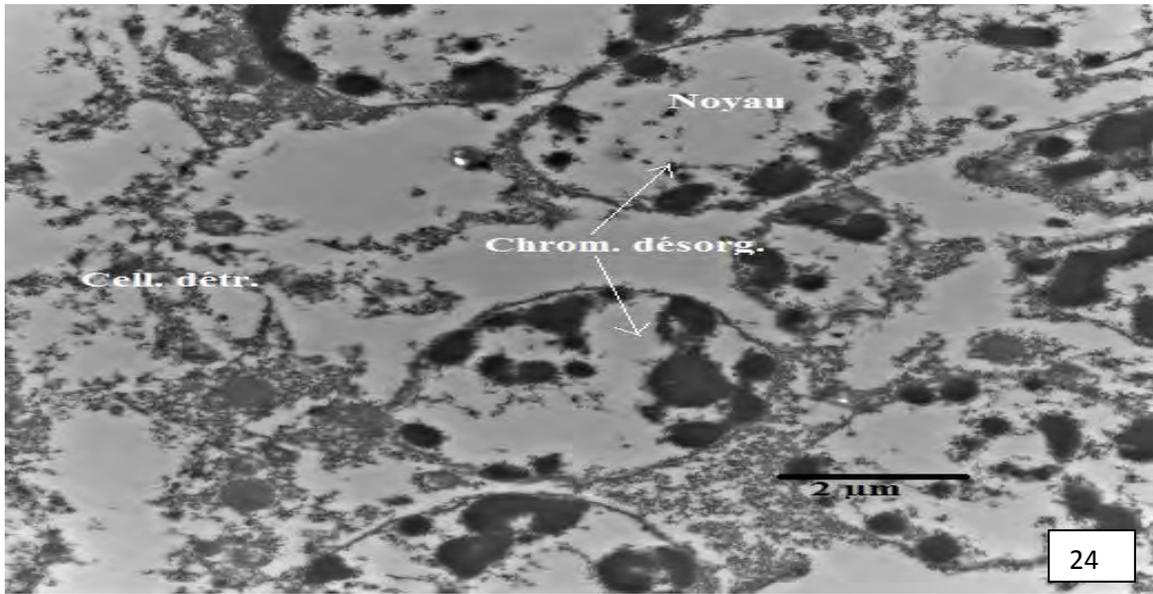


Figure 24: Ultrastructure de cellules épithéliales de l'intestin moyen d'une larve de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1%. On note une intense nécrose cellulaire.
Abbréviations: cell.détr.: cellules détruites.

Figure 25: Ultrastructure d'une coupe d'une larve de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* traitée au Suneem 1% et passant au niveau de la cuticule. La cuticule est désorganisée.

Abbréviations: cut. détr.: cuticule détruite

Figure 26: Ultrastructure d'une coupe d'une larve de *Culex quinquefasciatus* traitée avec le Suneem 1% et passant au niveau du tissu musculaire. Les fibres musculaires sont rompues.

Abbréviations: Fibr. musc.: fibres musculaires.

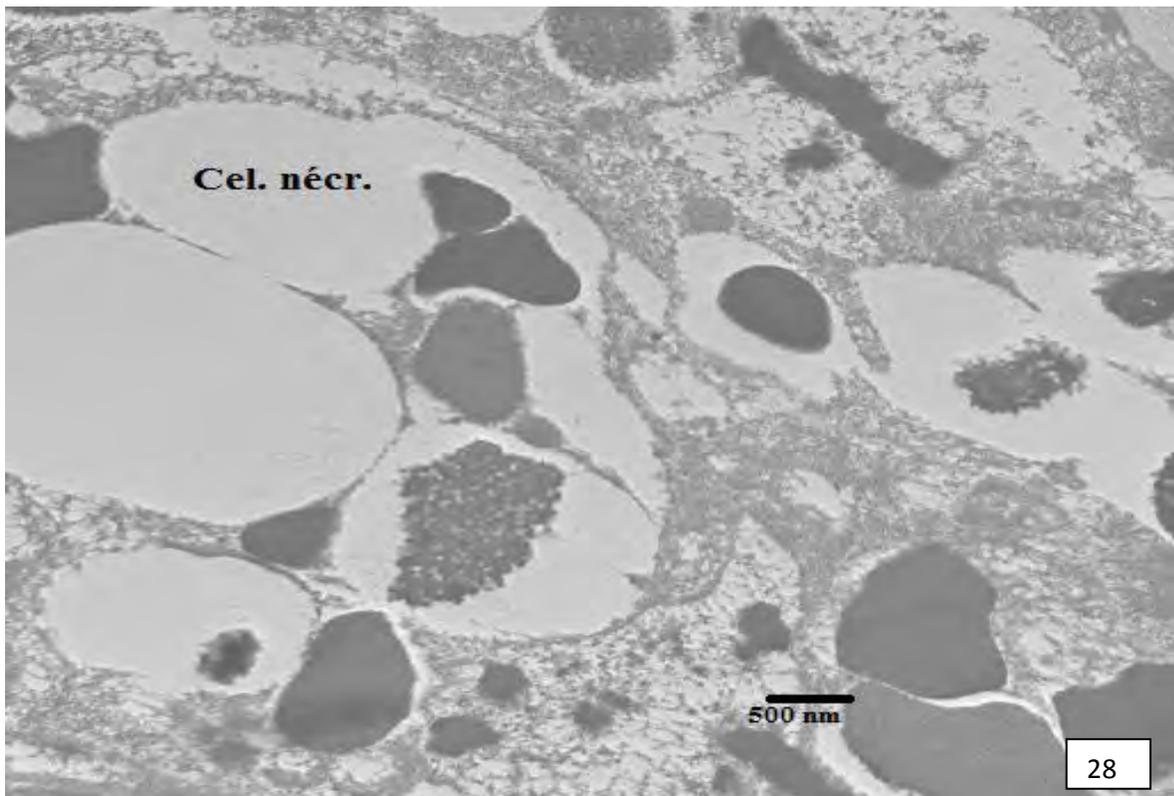
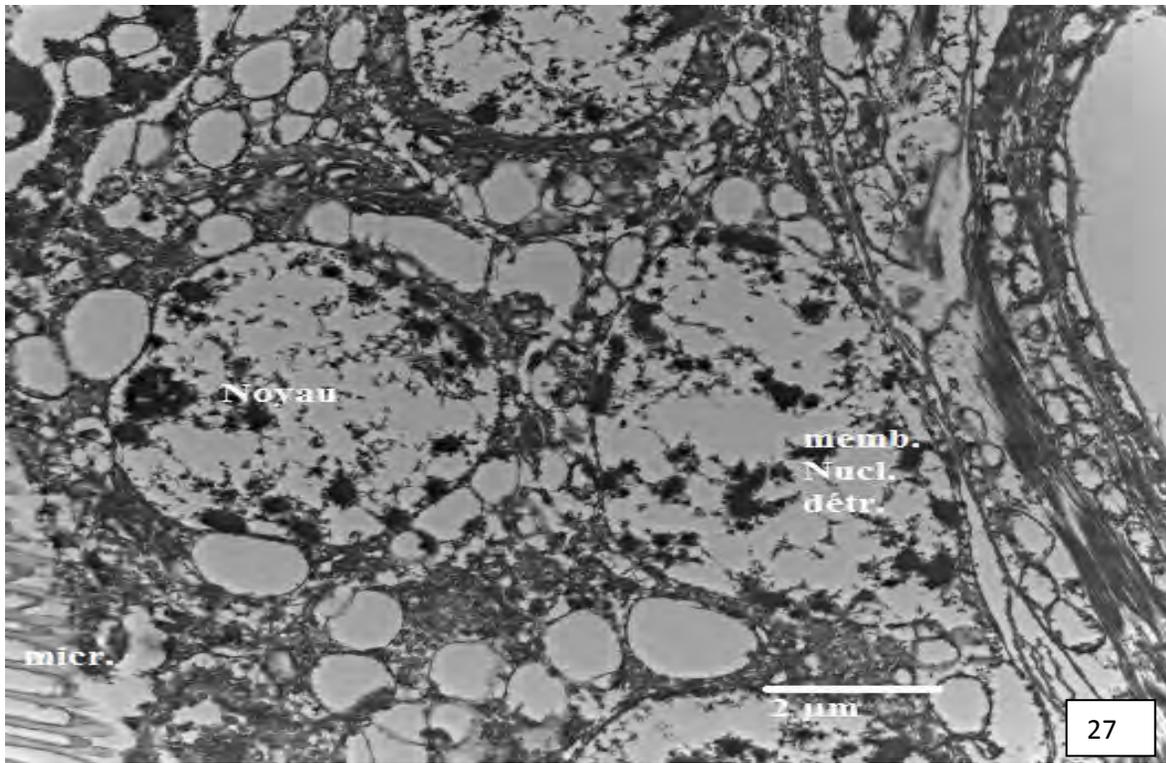


Figure 27: Ultrastructure d'une coupe de *Culex quinquefasciatus* passant au niveau de l'intestin moyen.

Abbréviations: Memb. Nucl. Détr.: Membrane nucléaire détruite

Figure 28: Ultrastructure d'une coupe de *Culex quinquefasciatus* passant au niveau de l'intestin moyen montrant des cellules nécrosées.

Abbréviations: Cel. Néc.: cellules nécrosées

IV. 5. DISCUSSION

Les coupes histopathologiques des larves du moustique *Culex quinquefasciatus* montrent un tube digestif, une cuticule et un tissu musculaire qui ont subi des dommages importants entraînant le plus souvent la mort de la larve. Le fait que ces tissus soient les plus affectés montrent qu'ils sont directement en contact avec l'azadirachtine du Suneem qui est à l'origine de leur intoxication. Al-Mehmadi et Al-Khalaf (2010) ont noté une destruction de l'épithélium de l'appareil digestif des larves de *Culex quinquefasciatus* par *Melia azedarach*. Nous avons fait le même constat dans notre étude que les chercheurs Al-Mehmadi et Al-Khalaf. Les pathologies cellulaires que nous avons notées dans notre étude sont :

- des espaces très élargis entre les cellules épithéliales,
- une hypertrophie cellulaire,
- des excroissances au niveau apical des cellules épithéliales,
- un éclatement de certaines cellules,
- une membrane péritrophique détruite,
- des nécroses cellulaires.

Ces pathologies du tube digestif des larves de *Cx quinquefasciatus* dans notre étude sont comparables à celles observées par Kellen *et al.* (1965). En traitant les larves de *Culex tarsalis* avec les souches de *Bacillus sphaericus*, Kellen *et al.*, 1965 ont noté une dégénérescence cellulaire de l'estomac postérieur et une vacuolisation qui envahit toutes les cellules du tube digestif au cours de l'infection. Karch et Coz (1983) montrent par ailleurs une perturbation du flux alimentaire des larves de *Cx pipiens*. Ils observent aussi un début d'infection des cellules mésentériques avec hypertrophie ou ballonnement cellulaire et formation de vacuoles. Karch et Coz (1983) observent, au niveau des cellules mésentériques en état d'infection avancée, une lyse, un éclatement suivis d'un rejet de matériel cytoplasmique dans la lumière intestinale. Les pathologies décrites sur *Cx pipiens* par Karch et Coz (1983) sont similaires aux résultats de cette étude. Cette comparaison des résultats de cette étude avec ceux de Karch et Coz (1983) prouvent que l'azadirachtine du Suneem 1% agit sur les cellules épithéliales intestinales et détruit le tube digestif et perturbe ainsi l'alimentation des larves entraînant la mort des larves de *Culex*. Les chercheurs Lina María Ruiz *et al.* (2004) ont montré que les toxines Cry 11 Bb du *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* ont leurs récepteurs au niveau de l'intestin des larves de *Culex quinquefasciatus* car cet organe de l'appareil digestif a été le plus affecté. Bien que les études sur

le site de réception de la molécule d'azadirachtine n'aient pas été faites, on est porté à croire au vue de la comparaison des résultats de cette étude avec celles de Lina María Ruiz *et al.* (2004) que l'azadirachtine du Suneem 1% a surtout son site de liaison au niveau de l'intestin de la larve. Les pathologies des cellules épithéliales observées dans cette étude sont principalement dues au brassage du Suneem 1% avec les aliments au niveau de l'intestin des larves de *Culex quinquefasciatus*. Ce brassage entraîne la libération de la molécule d'azadirachtine et sa fixation sur les récepteurs de la partie apicale des cellules intestinales. Cavados *et al.* (2004) traitant les larves de *Simulium pertinax* par du *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* notent des dommages importants de l'épithélium intestinal. Ces dommages se résument en une vacuolisation des cellules épithéliales intestinales, des destructions des microvillosités, des rejets de matériel cytoplasmique dans la lumière intestinale et enfin une nécrose cellulaire. Les résultats de cette étude sont en parfaite adéquation avec ceux de Cavados *et al.* (2004). Lina Maria Ruiz *et al.* (2004) quant à eux trouvent, en traitant les larves de *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus* par du *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*, les résultats suivants : une vacuolisation du cytoplasme, une hypertrophie des cellules épithéliales et de leur noyau, une altération de la bordure en brosse de la membrane, des lyses et des pertes de matériel cytoplasmique et une désintégration des cellules. Nous avons trouvé des résultats similaires à ceux de Lina Maria Ruiz *et al.* (2004). Nous pouvons par là dire que, les biopesticides à base de neem tuent les larves de moustiques par destruction des cellules épithéliales de leur appareil digestif. Koua *et al.* (1998) traitant les larves de *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902 à l'extrait aqueux de *Persea americana* Miller, 1768 trouvent d'importantes lésions au niveau de l'intestin moyen. Cependant contrairement à eux, nous avons trouvé d'importantes lésions de l'épithélium du tube digestif au niveau de l'intestin postérieur et du caecum. Toujours selon Koua *et al.* (1998), les premières cellules atteintes sont celles de la partie postérieure de l'estomac qui, après seulement 30 mn s'hypertrophient. Après une heure, la majorité des cellules de l'intestin postérieur est dégénérée. Il s'en suit un rejet de matériel cytoplasmique dans la lumière intestinale. Par la suite, ils constatent une lyse presque totale des cellules épithéliales. Ces résultats de Koua *et al.* (1998) sont presque similaires à ceux de cette étude. Nasiruddin et Mordue (1993), en mesurant l'effet de l'azadirachtine sur les criquets des genres *Schistocerca gregaria* et *Locusta migratoria* ont trouvé que certaines mitochondries sont longues et minces. La majorité des mitochondries est enflée. Ces mitochondries baignent dans un

cytoplasme dense à côté des citernes enflées. Le réticulum endoplasmique rugueux et lisse est dilaté de même que les membranes basales. Ces auteurs notent une vacuolisation importante. En plus de ces structures, quelques granules lipidiques, des lysosomes, les ribosomes et les granules de glycogène sont aussi observées. Une augmentation du nombre de vacuoles autophagiques est observée. Les résultats de cette étude montrent, contrairement aux résultats de Nasiruddin et Mordue (1993), des mitochondries qui sont intactes et donc pas attaquées. Mais les citernes du réticulum endoplasmique lisse sont enflées occasionnant une vacuolisation importante des cellules comme l'ont observée Nasiruddin et Mordue (1993). Syafruddin *et al.*, 1990 en étudiant les effets histopathologiques en ultrastructure du régulateur de croissance 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether sur les larves de *Aedes aegypti*, trouvent des mitochondries rompues, une vacuolisation importante et un cytoplasme pauvre en organelles. Nos résultats confirment ceux de Syafruddin *et al.*, 1990. Par ailleurs, les travaux de Sahar AB Fallatah (2010) portant sur le traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* par le « Fenugreek » (*Trigonella foenum graceum*) ont montré que les intestins moyen, postérieur, le tissu musculaire, le ganglion nerveux sont les plus affectés. Ces organes et tissus ont subi une rupture et une désintégration de l'épithélium ainsi qu'une vacuolisation des cellules épithéliales. Les résultats des travaux de Sahar AB Fallatah (2010) viennent confirmer les résultats de notre étude. Mais la seule différence est que nous n'avons pas observé une infection du ganglion nerveux.

IV. 6. CONCLUSION

Dans ce chapitre IV, les observations microscopiques ont permis de montrer de manière nette la cause de la mort d'une partie des larves traitées après 24 heures ou 48 heures. Et ces observations ont permis de retenir les faits suivants:

- une destruction de la cuticule et du tissu musculaire; ce qui explique la paralysie observée chez les larves de *Culex quinquefasciatus*;
- une hypertrophie des cellules épithéliales montrant des excroissances;
- une désorganisation de l'épithélium intestinal;
- des nécroses des cellules épithéliales avec une destruction du noyau et rejet de matériels cytoplasmiques dans le contenu stomacal.

CHAPITRE V :
INDUCTION ET DETERMINATION DES
GENES DE RESISTANCE DU *CULEX*
***QUINQUEFASCIATUS* AU SUNEEM 1%**

V.1. INTRODUCTION

Les maladies (telles que le paludisme, la fièvre-jaune, la dengue, les filarioses) commencent à être très nombreuses dans les villes mais aussi dans les campagnes des pays d'Afrique comme le Sénégal. La recrudescence de ces maladies est causée par la prolifération des moustiques dans les gîtes naturels. Au Sénégal par exemple, des campagnes de lutte contre les moustiques sont généralement menées par le service d'hygiène mais aussi par le Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme du Ministère de la Santé (PNLP). Ces campagnes de lutte, pour arriver à bout des moustiques (les larves, les nymphes et les adultes), utilisent des insecticides chimiques de synthèse. Une répétition des traitements des gîtes larvaires avec ces insecticides chimiques de synthèse a donné naissance à des individus possédant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques nuisibles à une grande population de moustiques. Ces moustiques sont des mutants qui possèdent un équipement enzymatique et physiologique leur permettant de survivre aux doses létales des insecticides chimiques de synthèse. De nombreux cas de résistance ont été notés partout dans le monde. Une résistance des espèces du complexe *A. gambiae* (*A. saccharovi*, *A. stephensi*, *A. culicifacies* et *A. sundarcus*) a été notée avec l'utilisation du DDT et de la Dieldrine (Hamon & Garret-Jones, 1963). *Culex tarsalis* a développé une résistance au Malathion en Californie. En 1960, une résistance similaire au Malathion a été notée chez *Culex pipiens fatigans* wiedeman au Cameroun (en Afrique) (Mouchet *et al.*, 1960). *Aedes nigromaculis* (Ludlow) a développé une résistance aux organophosphorés dans la région californienne (Lewallen & Nicholson, 1959). Aussi une résistance induite de l'espèce *Aedes aegypti* au Malathion a été faite au laboratoire par les chercheurs Brown & Abeni (1960). Des résistances commencent à se développer dans les traitements répétitifs des larves de moustique par des produits insecticides d'origine biologique tels que le neem (*Azadirachta indica*, A. Juss). Ce constat a été fait à la suite de plusieurs traitements en conditions de laboratoire des larves de moustique par des produits de neem. Les larves de moustique ont survécues aux différentes concentrations du neem. Ces constats ont été faits dans les travaux de Sèye *et al.* (2006 ; a & b), Ndione *et al.* (2006), Ndione *et al.* (2007). C'est fort de ce constat que nous sommes engagés dans la détermination des gènes de résistance du moustique *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%.

V. 2 MATERIEL ET METHODE

V. 2.1 MATERIEL

V.2.1.1 Modèle d'étude : le moustique *Culex quinquefasciatus*

Les moustiques utilisés dans cette étude sont issus de la population naturelle de *Culex quinquefasciatus* prélevés dans la banlieue (Parcelles Assainies, Pikine rue 10, Guediawaye-gadaye etc.) de la ville de Dakar (Sénégal) lors de sorties d'études sur le terrain mais aussi des gîtes artificiels de l'université Cheikh Anta Diop en conditions semi-naturelles. Les gîtes de la banlieue dakaroise sont soit des eaux pluviales ou des eaux usées des ménages stagnantes, des céanes etc. Les moustiques du genre *Culex quinquefasciatus* sont surtout récoltés dans les eaux riches en matières organiques. Ils sont soit récoltés sous la forme d'oeufs mais aussi de larves. Les oeufs et les larves sont transportés au laboratoire. A ce niveau, les oeufs ont éclos dans l'eau pour avoir des larves. Les larves sont élevées dans les conditions de température comprises entre 26°C +/- 2°C, d'humidité relative entre 80 et 85% et sous une photopériode de 12:12 heures (obscurité/lumière).

Les moustiques *Culex quinquefasciatus* proviennent aussi des gîtes artificiels du département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal). Ils sont récoltés à l'état larvaire.

Pour l'étude des gènes susceptibles d'entraîner une résistance des moustiques *Culex quinquefasciatus* trois types d'échantillons de *Culex quinquefasciatus* sont utilisés :

- des moustiques collectés à Dakar banlieue et/ou dans des gîtes artificiels du département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal) sont élevés dans les conditions du laboratoire et ne sont pas traités par le Suneem 1% (**DSenCq^{G0}**: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération zéro),
- des moustiques obtenus dans les mêmes conditions que les premiers et traités par le Suneem 1% jusqu'à la 5^{ième} génération. Ces moustiques ont montré une insensibilité aux DL50 qui les tuaient normalement (**DSenCq^{G5}**: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération cinq),
- des moustiques traités au Suneem 1% et qui sont morts (**DSenCq^{G1}**: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération 1 = moustiques morts après traitement).



Figure 29 : Photo d'une larve de stade 4 de *Culex quinquefasciatus*. Abréviations : SR : stigmate respiratoire ;

Figure 30 : des larves traitées et mortes (DSenCq^{G1});

Figure 31 : des larves qui ont survécues aux différents traitements (DSenCq^{G5});

Figure 32 : des larves témoins ou larves non traitées ou populations souches naturelles (DsenCq^{G0}).

V.2.1.2. Pourquoi chercher à déterminer la résistance du *Culex quinquefasciatus*

Ce choix s'explique par le fait que :

- le moustique *Culex quinquefasciatus* est prédominant dans les zones urbaines et péri-urbaines de dakar. Ce moustique est pendant longtemps soumis aux traitements par les insecticides répandus par les services d'hygiène et autres services de lutte antivectorielle.
- avec le phénomène de la résistance croisée, *Culex quinquefasciatus*, qui a déjà montré au Sénégal et dans le monde une résistance kdr (knockdown résistance) et par détoxification enzymatique à beaucoup d'insecticides en particulier les pyréthrinoides, pourrait par résistance croisée développer une autre forme face au Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss). Il est donc nécessaire de connaître le niveau de résistance des moustiques du genre *Culex quinquefasciatus* avant toute utilisation à grande échelle dans les gîtes.

V.2.1.3. Le produit bioinsecticide : Suneem 1% EC

Le produit bioinsecticide utilisé dans cette étude est le SUNEEM 1%. C'est un produit formulé à partir de l'azadirachtine, d'un adjuvant et d'un solvant le Tétrahydrofurfuryl alcool (THFA). Il a été fourni par une industrie sénégalaise de formulation des produits insecticides sise au km 13 route de Rufisque, dakar (Sénégal) dénommée la SENCHIM.

DSenCq^{G0}: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération zéro; **DSenCq^{G1}** : Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération un; **DSenCq^{G5}**: Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus*, génération cinq **Abbréviations:** **HNP**: huile de neem pure, **HNF**: huile de neem formulée, **PN**: poudre de neem, **PTN**: poudre technique de neem, THFA: Tetrahydrofurfuryl Alcool.



33



34



35



36



37

Figure 33: Les feuilles du neem *Azadirachta indica* A. Juss.

Figure 34 : Les fruits verts du neem *Azadirachta indica* A. Juss.

Figure 35 : Les amandes sèches du neem *Azadirachta indica* A. Juss.

Figure 36: L'huile de neem (Suneem 1%) extrait de *Azadirachta indica* A. Juss.

Figure 37: L'huile de neem formulée avec le THFA (Tétrahydrofurfuryl Alcool) et conditionnée dans des bidons Suneem 1% EC

(Source : photos du Laboratoire de Biologie de la Reproduction).

V.2.2 METHODE

V.2.2. 1. Traitement des larves de *Culex quinquefasciatus* par le Suneem 1%

Les larves de *Culex quinquefasciatus* sont traitées dans les conditions de laboratoire (une température moyenne de $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, une humidité relative $82^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$). Des quantités croissantes de Suneem 1% ont été mélangées avec 500 ml d'eau distillée dans chaque bocal pour ainsi obtenir les concentrations allant de 2 mg/l (Bocal 1), 4 mg/l (Bocal 2), 6 mg/l (Bocal 3), 8 mg/l (Bocal 4), 10 mg/l (Bocal 5), 12 mg/l (Bocal 6), 14 mg/l (Bocal 7), 16 mg/l (Bocal 8), 18 mg/l (Bocal 9), 20 mg/l (Bocal 10). Cent (100) larves sont comptées puis immergées dans chaque bocal. Pendant le traitement, les larves sont nourries avec de la poudre de pain. Un bocal témoin a été utilisé avec 500 ml d'eau distillée et 100 larves de *Culex quinquefasciatus* (Figures 6, 7A, 7B et 8). Il faut noter qu'avant les traitements, des larves de *Culex quinquefasciatus* sont laissées pour émerger en adultes dans des cages de dimensions 50 x 50 x 50cm. Ensuite ces adultes sont fixés dans de l'éthanol 70% et constituent les échantillons dénommés **DSenCq^{G0}**. Ces moustiques constituent la population naturelle (ou pop. nat.). Par contre, les larves survivantes au traitement sont aussi comptées et mises en émergence dans des cages de dimensions 50 x 50 x 50 cm dans les conditions du laboratoire. Les adultes de moustiques (génération F1) obtenus après émergence sont laissés pour un accouplement. Après un repas sanguin avec un rat albinos, les femelles ont pondus. Les œufs ont été récoltés et mises en éclosion. A l'éclosion, nous avons obtenu des larves de génération 2 qui vont émerger en adultes de génération 2 (F2). Ce même procédé a été appliqué jusqu'à l'obtention de la génération 5 (F5). Ces moustiques de la F5 ont été fixés dans de l'éthanol 70 % et constituent les échantillons dénommés **DSenCq^{G5}** (= Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus* génération 5 « insensible »). Des larves de *Culex quinquefasciatus* prélevées directement des gîtes sont laissées émerger en adultes. Ces adultes sont traités. Les morts sont fixés dans de l'éthanol 70 % et constituent les échantillons dénommés **DSenCq^{G1}** (= Dakar, Sénégal, *Culex quinquefasciatus* génération 1 « sensible »).

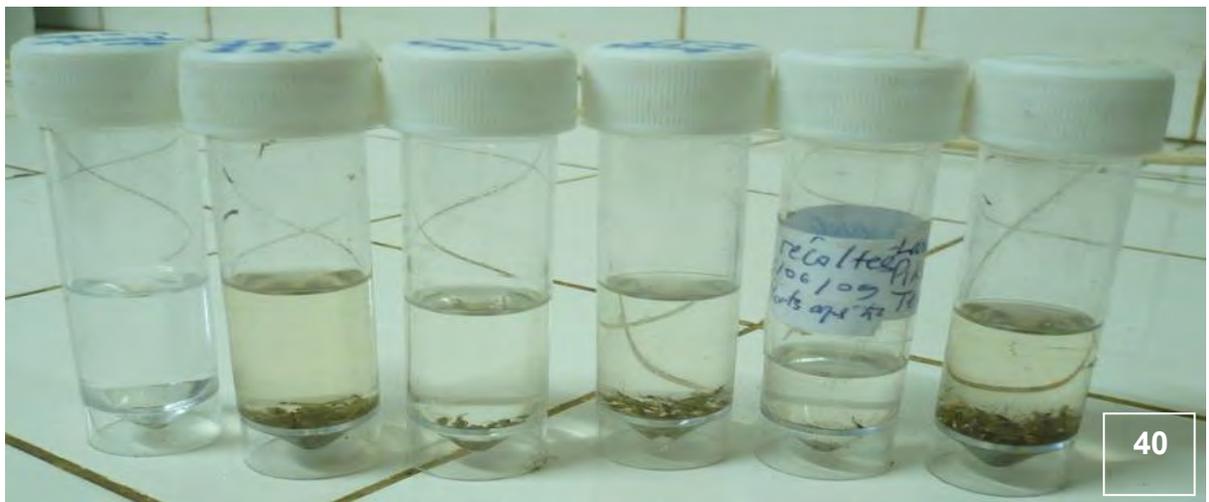
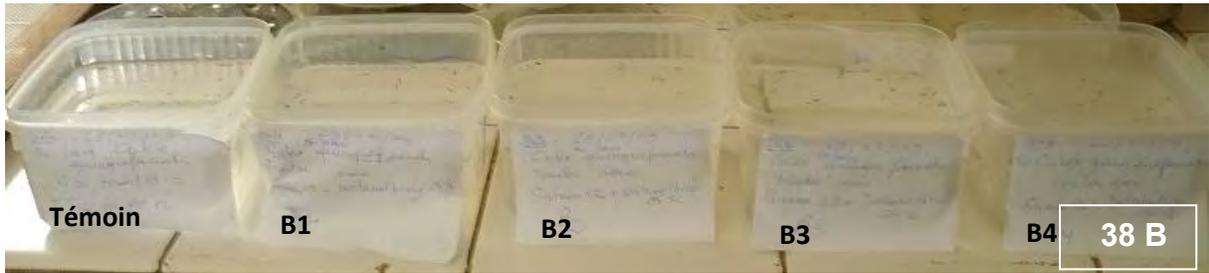
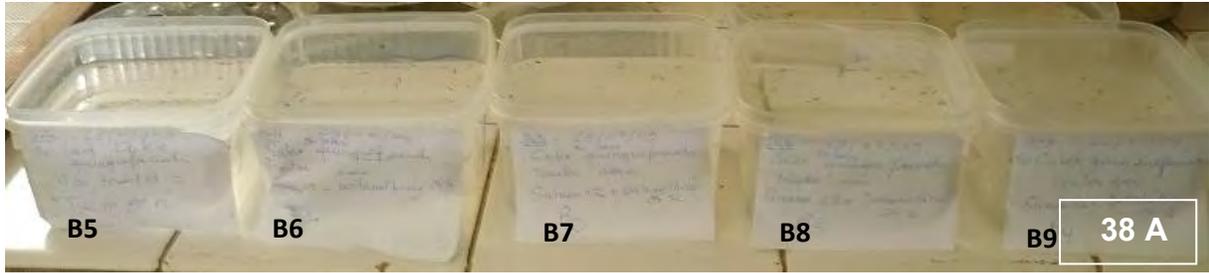


Figure 38 A et B : induction de la résistance par traitement des larves de stade 3 de *Culex quinquefasciatus* avec des concentrations croissantes en Suneem 1%

Figure 39 A et B : Adultes de moustique *Culex quinquefasciatus* émergés de larves qui ont survécues au traitement par le Suneem 1%. Ces adultes vont subir un gorgement et vont des œufs à partir desquels une nouvelle génération sera obtenue.

Figure 40 : Quelques adultes de moustique émergés et fixés dans de l'éthanol à partir de larves survivantes au 1^{ier} traitement.

V.2.2.2. Les gènes étudiés

A. Préalables à l'étude des gènes

a. Choix des gènes

Nous avons choisi d'examiner deux gènes impliqués dans les résistances des moustiques aux insecticides en général mais spécifiquement ceux qu'on suppose pouvant intervenir dans la résistance aux produits à base de neem (comme le Suneem 1% EC). Nous avons retenu deux types de gènes :

- le gène **kdr** (knockdown résistance) impliqué dans la résistance des moustiques adultes au Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss). Ce gène est impliqué dans les mutations au niveau des canaux sodiques voltage-dépendant. En effet, il perturbe le fonctionnement de la pompe sodium-potassium indispensable au fonctionnement des cellules excitables.
- les gènes **Estérases B** qui codent pour des estérases qui sont des enzymes détoxifiantes envers les insecticides.

b. Recherche des séquences nucléotidiques

Elles ont été extraites à partir de la banque de données du génome de *Culex quinquefasciatus* ([http://ncbi.nlm.nih.gov/mapview/mapsearch.cgi.chr = *Culex quinquefasciatus* int](http://ncbi.nlm.nih.gov/mapview/mapsearch.cgi.chr=Culex%20quinquefasciatus%20int)). Le numéro d'accession permet de connaître la position de la séquence nucléotidique correspondante au gène sur son scaffold. Un scaffold représente la séquence nucléotidique d'un fragment de chromosome, sa taille peut aller jusqu'à 1 Mb.

c. Détermination des amorces (ou Primers) PCR

Des amorces PCR ou "primers" ont été recherchées de manière à amplifier des fragments des gènes kdr et des estérases selon la taille du gène et comportant des régions codantes et non codantes. L'obtention des amorces se fait généralement à l'aide du logiciel Primer 3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Mais dans notre étude, nous avons utilisé les amorces cités des travaux de Qiang *et al.*, 2006 et Qiang *et al.*, 2011 qui ont travaillé sur les mêmes gènes.

B. Etude des gènes proprement dit

B.1. Extraction de l'ADN des 3 types d'échantillons du *Culex quinquefasciatus*

Deux types d'extraction de l'ADN des 3 types d'échantillons (DSenCq^{G0}, DSenCq^{G1} et DSenCq^{G5}) sont faites: l'extraction par la méthode du phénol-chloroforme et celle par le DNA IQ.

B.1.1. Extraction de l'ADN par la méthode du phénol-chloroforme

Les échantillons de *Culex quinquefasciatus* sont placés dans un tube eppendorf type 1,5 ml contenant 300µl d'une solution tampon (50 Mm Tris-HCl, ph = 8, SDS 1%, 25 Mm EDTA) et 20µl de protéine kinase de 20 mg/l. Le tube est placé au bain-marie à 65°C pendant 60 mn pour inhiber l'activité des enzymes pouvant détruire l'ADN. Nous avons ajouté par la suite un volume égal de phénol : chloroforme : isoamylique (25 : 24 : 1) dans le tube et on l'a secoué doucement pour mélanger les phases. Puis nous avons centrifugé le mélange à 12 000 tours par minutes pendant 5 mn pour séparer les phases. Ensuite, nous avons enlevé la phase aqueuse dans un nouveau tube et avons ajouté un volume égal de chloroforme pour enlever toute trace de phénol. Pour avoir l'ADN nous l'avons précipité suivant cette procédure :

Nous avons ajouté 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M PH = 5,2 et 2 volumes d'éthanol 100% stockés à -20°C. Puis nous avons mélangé et conservé le tube à - 20°C pendant une heure ou jusqu'à ce que les brins d'ADN en solution apparaissent. La solution est ensuite centrifugée à 14 000 tours par minutes dans une microcentrifugeuse standard pendant 10 minutes. Nous avons laissé décanter le surnageant puis laver le culot d'ADN avec 1 ml d'éthanol 70% à la température ambiante. Le culot a été ensuite séché. Enfin, l'ADN a été resuspendu avec 100 µl de TRIS-EDTA puis gardé au froid à 4°C pendant au moins une nuit avant toute utilisation.

B.1.2. Extraction de l'ADN par la méthode du DNA IQ

Nous avons coupé les échantillons de moustique (DSenCq^{G0}, DSenCq^{G1} et DSenCq^{G5}) et nous les avons placés dans des tubes eppendorf. Puis nous avons ajouté la solution tampon de lyse et incubé le tout à 65°C pendant 30 minutes. Le tampon de lyse et les échantillons de moustique sont centrifugés afin de concentrer au fond les débris de tissus. Puis nous avons transféré le surnageant dans un nouveau tube eppendorf et nous avons ajouté une solution de résine pour resuspendre l'ADN. Après avoir vortexé, nous avons incubé le tout à la température ambiante. Par la suite, nous avons encore vortexé et placé le tube dans un stand magnétique. En faisant attention, nous avons mis de côté la solution sans pour autant perturber la résine. Ensuite, nous l'avons lavé 3 fois avec 1X de tampon. Par suite, nous avons séché les échantillons à 35°C. Nous avons ajouté le tampon d'élution et incubé le tout à 65°C pendant 5 minutes. Ensuite, nous avons ôté les tubes de l'étuve; pour ensuite les vortexer et les placer sur une plaque magnétique. Enfin, nous avons isolé la solution d'ADN.

B.1.3. Amplification du gène Kdr du canal sodium de *Culex quinquefasciatus*

Deux amplifications ont été réalisées :

1^{ère} amplification : Les échantillons d'ADN sont amplifiés par PCR selon les concentrations des réactifs indiquées ci-dessous :

Réactifs	Volume	C. finale
Go Taq Green Master Mix (Promega Buffer, MgCl ₂ , dNTP, DNA polymerase)	12, 5µl	1X
KDR S1 (5' CTTACTCATTTCATCATGG 3')	0,5 µl	0,2 µl
KDR AS1 (5'GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG 3')	0,5 µl	0,2µl
Echantillon d'ADN extrait	1,5 µl	< 250 ng
Eau avec nucléases		25µl
Chauffage : 95°C pendant 5min		
94°C pendant 30s, 55°C pendant 30s 72°C pendant 1 min	} 40 cycles de PCR	
extension finale de 72°C pendant 10 min.		

2^{ème} amplification

Réactifs	Volume	C. finale
Go Taq Green Master Mix (Promega Buffer, MgCl ₂ , dNTP, DNA polymerase)	12, 5µl	1X
KDR AL S1 (5' GCGTTAGGTAATCTGACGTTTGTGC 3')	0,5 µl	0,2 µl
KDR AS1 (5'GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG 3')	0,5 µl	0,2µl
L'ADN amplifié des 3 types d'échantillons	1,5 µl	< 250 ng
Eau avec des nucléases		25µl
Chauffage : 95°C pendant 5min		
94°C pendant 30s, 55°C pendant 30s 72°C pendant 1 min	} 38 cycles de PCR	
extension finale de 72°C pendant 10 min.		

B.1.4. Electrophorèse

Préparation du gel :

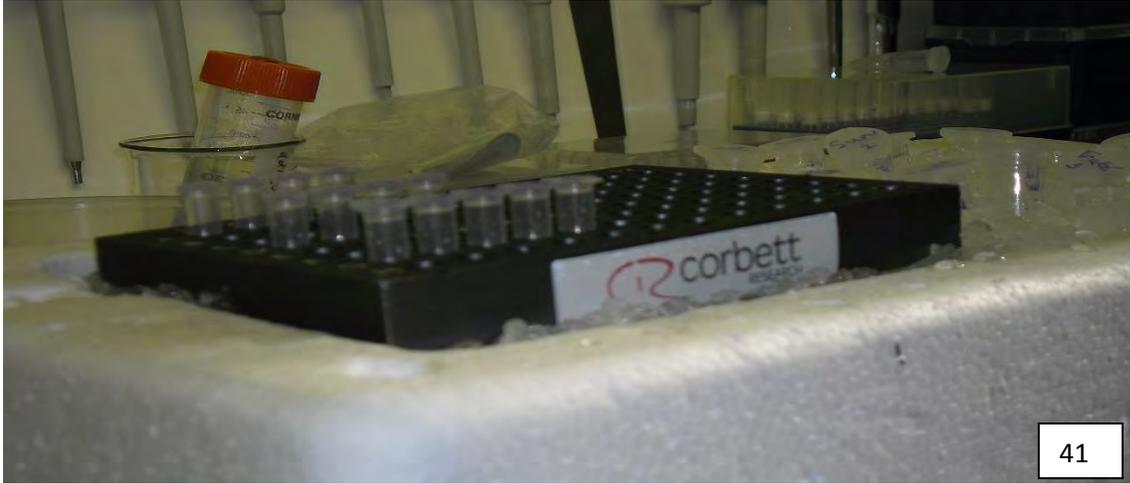
Pour avoir un gel à 1% d'agarose, nous avons dilué 800 mg d'agarose (Promega) dans 80 ml de tampon TBE 1X (Tris Borate Acide, EDTA) que nous avons placé au four à microondes pendant environ 2 mn. Par la suite, nous y avons ajouté 5µl de bromure d'éthidium pour obtenir une concentration de 0,5 mg/ml dans le gel d'agarose. Puis nous avons coulé le gel dans le moule portant les peignes en prenant soin de bien dégager les bulles d'air. Nous avons ensuite attendu que le gel se polymérise avant de le transférer dans le bac contenant le tampon TBE à 0,5X comme électrolyte. L'ADN amplifié est logé dans les puits du gel ainsi que le marqueur de taille. La migration a été conduite sous un courant de 70 volts pendant 60 minutes, à l'aide d'un générateur d'Electrophorèse. Après la migration, les bandes ont été photographiées à l'aide d'une boîte à UV et ensuite visualisées par un ordinateur connecté. La taille des produits amplifiés a été estimée grâce à la présence un marqueur de taille ayant des bandes de poids moléculaires connus de 200 pb ADN Ladder, Promega.

B.1.5. Purification

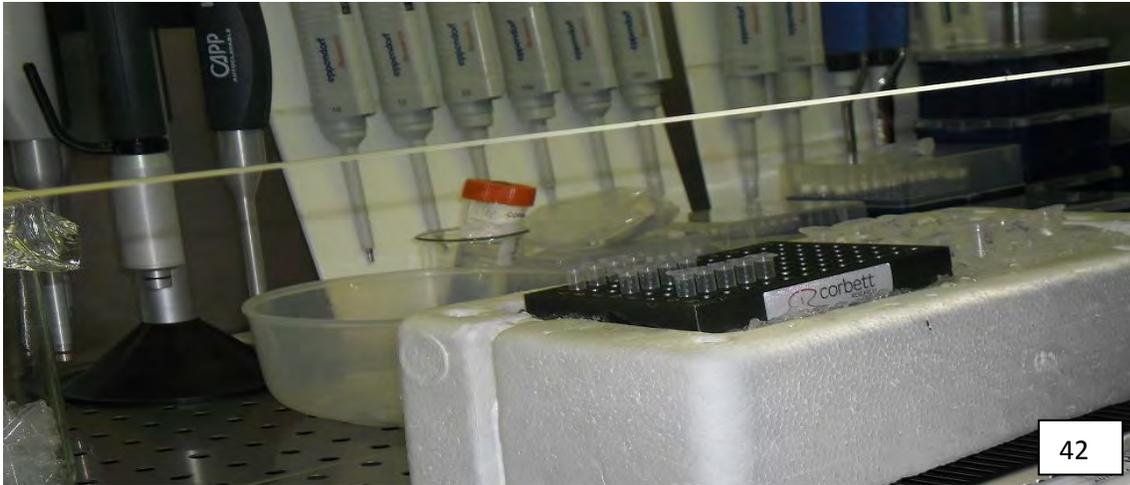
Nous avons préparé d'abord une solution fraîche de purification avec du glycogène selon le mélange suivant :

3M NaAc (µl)	2	32
100mM Na-EDTA	2	32
20mg/ml glycogen	1	16
TOTAL (µl)	5 µl	80

Puis nous avons ajouté dans chaque tube 5µl de cette solution mélangée avec le glycogène. Nous avons transféré la réaction de séquençage dans des tubes convenablement étiquetés de 0,2 ml et que nous avons bien mixé. Puis nous avons ajouté 60 µl d'un mélange (v/v) ethanol / eau de -20°C et nous l'avons bien mixé. Après nous avons centrifugé les tubes à 14000 tours à 4°C pendant 15 minutes. Nous avons soigneusement éliminé le surnageant avec une micropipette. Par la suite, nous avons séché pendant 10 minutes. Ensuite, nous avons remis en suspension les échantillons dans 40 cl de la solution de chargement des échantillons fourni avec le kit.



41



42



43



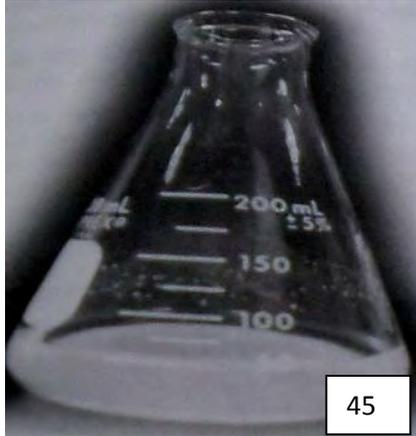
44

Figure 41 : Placement des échantillons dans les tubes eppendorf avec la solution tampon Tris Edta

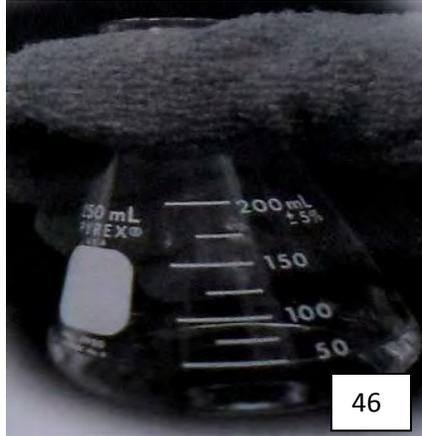
Figure 42 : Ajout d'un volume de phénol-chloroforme-isoamylique (25 : 24 : 1) dans les tubes.

Figure 43 : Centrifugation du mélange à 2000 Tours par minutes pendant 5 minutes pour séparer les phases.

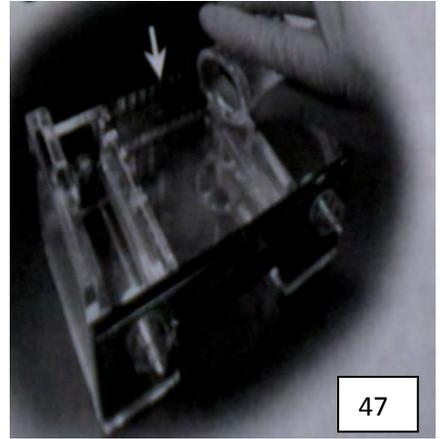
Figure 44 : Dosage de la quantité d'ADN



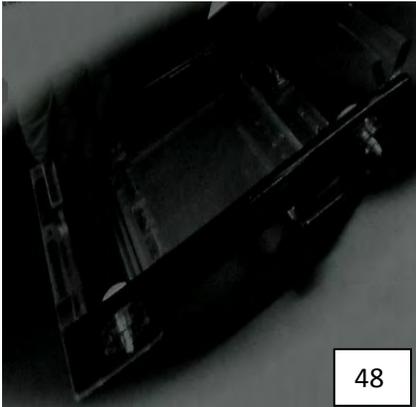
45



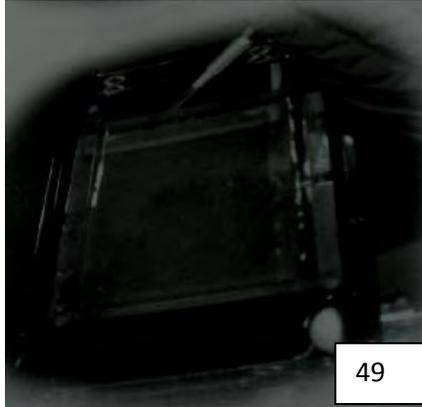
46



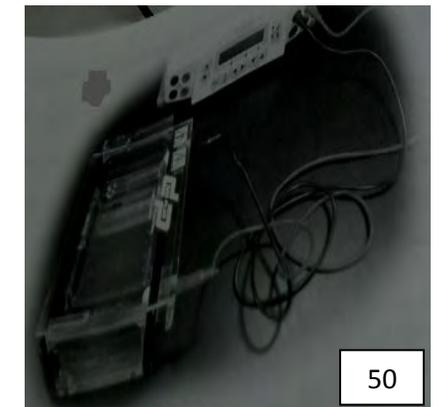
47



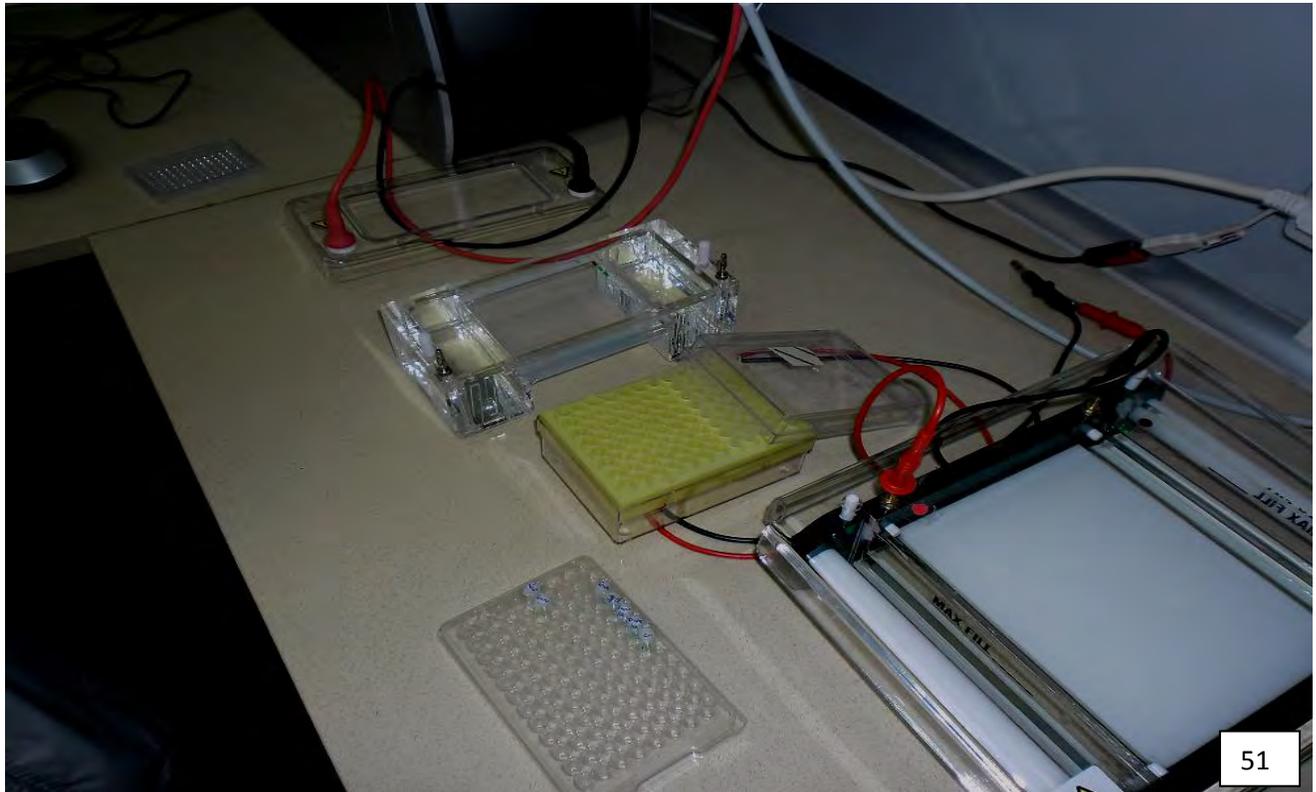
48



49



50



51

Figure 45 : Préparation du gel d'Agarose

Figure 46 : Solution d'agarose bien dissoute dans le tampon

Figure 47 : Coulage du gel et placement des peignes

Figure 48 : Enlèvement des peignes

Figure 49 : Chargement de l'ADN standard dans le premier puits et les échantillons d'ADN dans les puits restants.

Figure 50 : Placement du couvercle et branchement du dispositif.

Figure 51 : Dispositif de l'électrophorèse en marche.

B.1.6. Séquençage

Le séquençage des fragments purifiés a été réalisé grâce à un séquenceur automatique. Le stockage du kit cycle de séquençage a été faite à -20°C dans un congélateur.

Préparation de la réaction de séquençage de l'ADN

La réaction de séquençage a été préparée dans 0,2 ml d'un tube mince ou dans des puits de microplaques. Tous les réactifs ont été conservés dans la glace tout en préparant les réactions de séquençage, et ont été ajouté dans l'ordre indiqué ci-dessous.

dH2O (pour ajuster le volume total à 20 ml)	0- 9,5µl
Matrice d'ADN (voir la préparation de modèle)	0,5- 100 µl
47 amorces de séquençage (1,6 pmol/µL or 1,6 µM)	2 µl
DTCS Quick Start Master Mix	8,0 µl
Total	20µl

Remarque: les composants de la réaction sont soigneusement mélangés. Le liquide est consolidé dans le fond du tube par une brève centrifugation avant le séquençage.

Ce mélange réactionnel a été soumis à un cycle de séquençage au niveau du séquenceur :

96°C	→ 20 secondes	} pendant 30 cycles à 4°C
50°C	→ 20 secondes	
60°C	→ 4 minute	

L'analyse par ordinateur des signaux recueillis par le photomètre permet d'établir la séquence avec une grande précision.

V.3. RESULTATS

V.3.1. ETUDES DE GENES DE RESISTANCE DU *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

a. Les concentrations de l'ADN extrait et ses absorbances

Les concentrations de l'ADN extrait par la méthode du phénol-chloroform et celle du "DNA IQ" pour les 3 types d'échantillons de *Culex quinquefasciatus* ainsi que leurs densités optiques sont données dans les tableaux suivants:

Tableau 8 : Concentrations et densités optiques de l'ADN extrait par " DNA IQ"

Echantillons	Abs260	Abs280	Abs320	260/280	260/320	Concentration (ng/ul)
D SenCq G0	0,146	0,139	0,688	1,05	0,21	7,3
D Sen Cq G5	0,206	0,185	1 009	1,11	0,2	10,2
D Sen Cq G1	0,336	0,324	2 192	1,04	0,15	16,7

Tableau 9: Concentrations et densités optiques de l'ADN extrait par " Phénol-chloroform"

Echantillons	Abs260	Abs280	Abs320	260/280	260/320	Concentration (ng/ul)
D SenCq G0	2 205	1 098	0,623	2,01	3,54	110,2
D Sen Cq G5	1,51	0,734	0,173	2,06	8,73	75,5
D Sen Cq G1	0,703	0,433	-0,396	1,62	-1,78	35,1

En regardant de près ces résultats, nous notons qu'après extraction et purification, que l'ADN du moustique *Culex quinquefasciatus* est plus concentré avec l'extraction par la méthode du phénol-chloroform qu'avec celle du DNA IQ soit des différences significatives de l'ordre de 102,9 (population naturelle : DSenCqG0), de 65,3 (population survivante : DSenCqG5) et de 18,8 (pour la population morte : DSenCqG1).

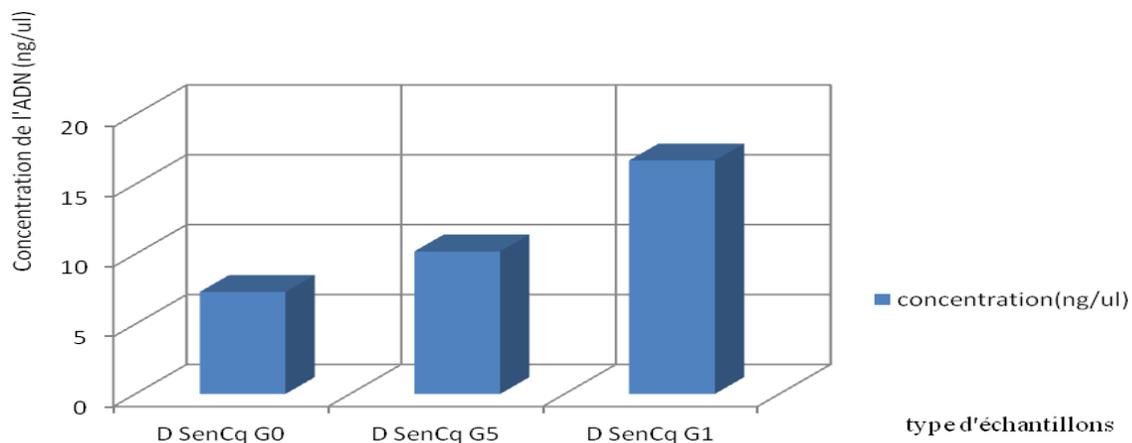


Figure 52 : Concentration de l'ADN extrait par la méthode du DNA IQ des 3 types d'échantillons du moustique *Culex quinquefasciatus*.

L'analyse de ce graphe (Figure 52) montre que l'ADN du *Culex quinquefasciatus* de la 1^{ère} génération (DSenCqG1) est plus concentré respectivement de 5ng/μl et 10ng/μl que ceux des générations G5 (DSenCqG5) et G0 (DSenCqG0).

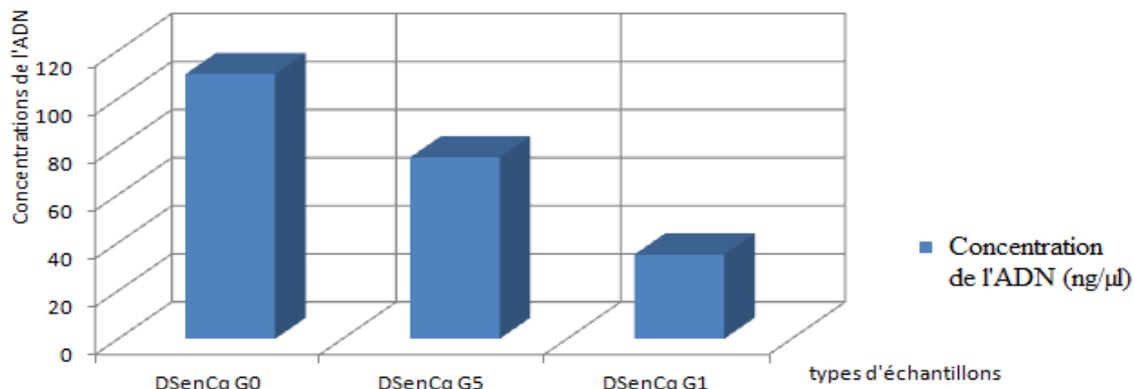


Figure 53 : Concentration de l'ADN extrait par la méthode du Phénol-chloroform des 3 types d'échantillons du moustique *Culex quinquefasciatus* (ng/μl).

Par contre l'extraction avec le DNA IQ a montré des résultats contraires à l'extraction par le phénol-chloroform. En effet, cette méthode d'extraction a donné une concentration de l'ADN de *Culex quinquefasciatus* de la génération G0 (DSenCqG0) plus forte respectivement de 40 ng/μl et de 80 ng/μl que les générations G5 (DSenCqG5) et G1 (DSenCqG1).

En comparant ces deux graphes (Figures 52 et 53), nous constatons que la quantité de l'extrait d'ADN est plus grande au niveau des échantillons obtenus par la méthode « phénol-chloroform » que ceux obtenus par celle du « DNA IQ ». En plus les rapports des absorbances 260/280 des échantillons obtenus par la méthode « DNA IQ » sont tous compris entre 1,8 et 2. Par conséquent l'ADN extrait par DNA IQ est pure. Par contre les rapports des échantillons obtenus par la méthode « phénol-chloroform » sont supérieurs à 2. Par conséquent, l'ADN de ces échantillons est contaminé probablement par des protéines. Ceci explique du coup les différences dans les quantités constatées plus haut.

Tableau 10: Concentrations et densités optiques de l'ADN d'un portion du gène Kdr amplifié avant le séquençage.

Echantillons	Abs260	Abs280	Abs320	260/280	260/320	concentration(ng/ul)
D SenCq G0	0,984	0,576	0,756	1,71	1,3	49,2
D Sen Cq G1	0,865	0,498	0,49	1,74	1,77	43,2

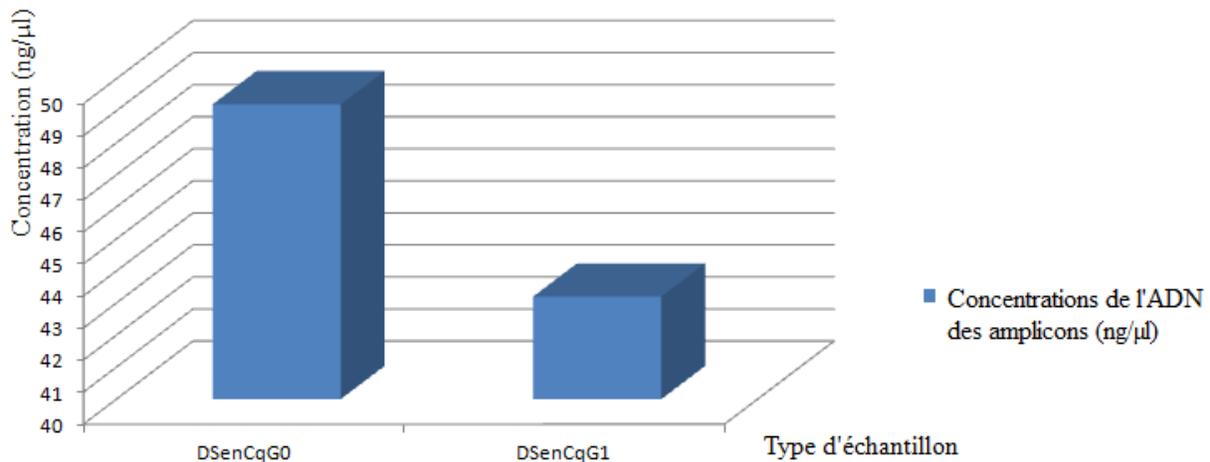


Figure 54 : Concentrations des amplicons (gènes amplifiés) de deux types d'échantillons de *Culex quinquefasciatus* (ng/μl).

En comparant la concentration de l'ADN des produits amplifiés, on constate que l'ADN des amplicons des échantillons DSenCqG0 (génération zéro) est plus concentré que celui des amplicons des échantillons DSenCqG1 (génération 1).

b. Les amplicons du gène kdr du canal sodium voltage dépendant révélés par électrophorèse

La 1^{ère} amplification a donné les résultats suivants:

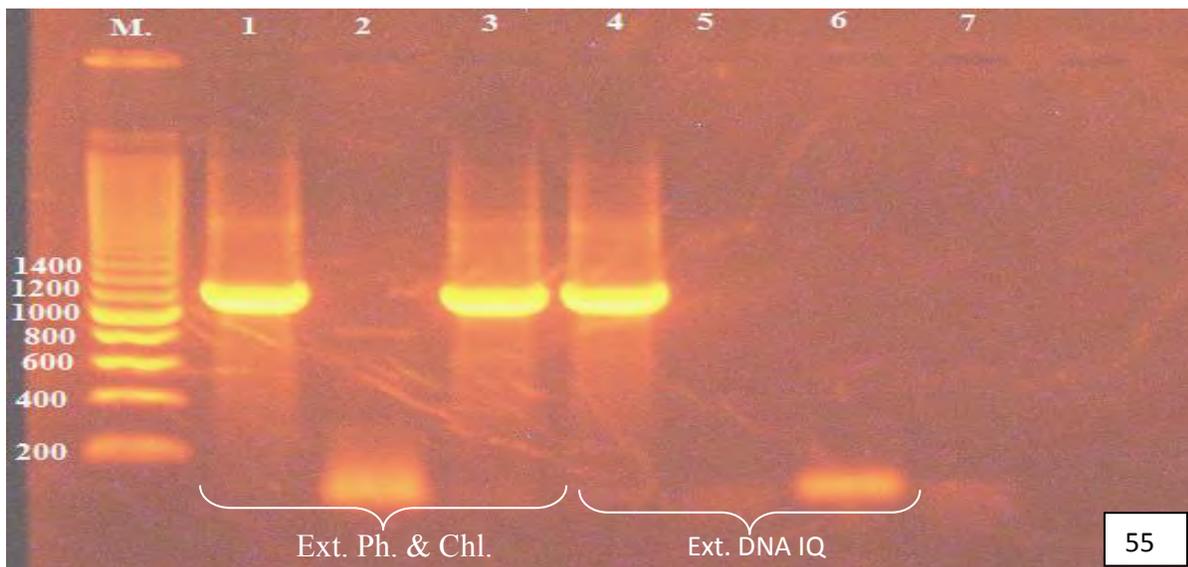


Figure 55 : amplicons du gène kdr des 3 échantillons de *Culex quinquefasciatus* relévés par électrophorèse sur gel d'Agarose (Promega®) avec M.= marqueur ; 1 et 4 = DSenCqG0 ; 2 et 5 = DSenCq G5 ; 3 et 6 = DSenCqG1 ; 7 = Témoin négatif ; Ext. Ph.& Chl. = Extraction par phénol-chloroforme ; Ext. DNA IQ = Extraction par DNA IQ.

Cet électrophorèse visible à la figure 55 a montré une amplification du gène Kdr du canal sodium voltage-dépendant au niveau des populations naturelles de *Culex quinquefasciatus* aussi bien avec l'extraction par le phénol-chloroform que par celle du DNA IQ. Cette amplification du gène Kdr est aussi visible au niveau des populations de *Culex quinquefasciatus* mortes après 24 heures de traitement au Suneem 1% (génération une ou G1) surtout avec l'extraction par le phénol-chloroform.

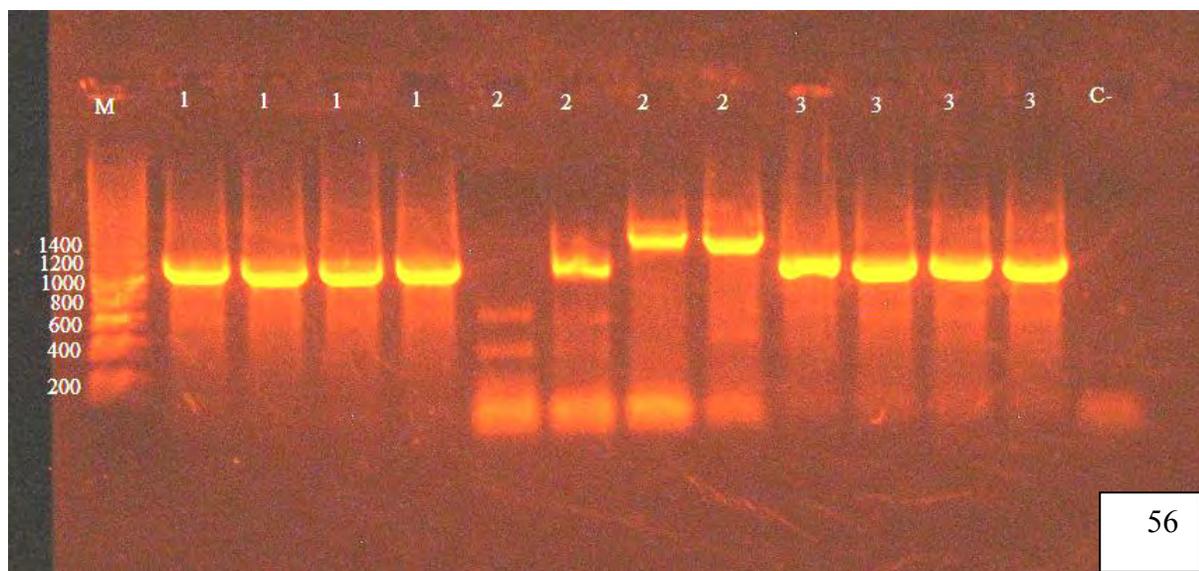


Figure 56 : Amplicons du gène kdr des 3 échantillons de *Culex quinquefasciatus* rélevés par électrophorèse sur gel d'Agarose (Promega®) avec M.= marqueur de taille, 1= DSenCqG0, 2 = DSenCq G5, 3 = DSenCqG1, C = Témoin négatif; Ext. Ph.& Chl. = Extraction par phénol-chloroform.

Cet électrophorèse de la figure 56 montre des amplifications du gène kdr du canal sodium voltage dépendant au niveau des populations naturelles génération zéro G0 (DSenCq G0) à 1000 pb, des populations traitées et mortes après 24 heures génération 1 G1 (DSenCqG1) à 1000 pb et des populations résistantes après cinq générations G5 (DSenCqG5) de *Culex quinquefasciatus* à 1200 et 1400 pb.

En faisant une analyse corrélative des deux électrophorèses, nous constatons une amplification du gène Kdr à 1200 pb au niveau des populations naturelles de *Culex quinquefasciatus* et aussi au niveau des échantillons de *Culex quinquefasciatus* qui ont survécues au traitement par le Suneem 1% après 5 générations (DSenCqG5) à 1200 pb et ceux qui sont morts après 24 heures à 1000 pb.

V.3.2. Les résultats de séquençage des amplicons

Les résultats de séquençage sont:

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

```
G A C T G A A T T T C C C T A T A C A C T A C A G T G G C C A A G A A A A A T G  
A C G A C T G A A T T T C C C T A T C A C T A C A G T G G C C A A G A A A A A T G  
40
```

Séquence témoin

```
G C G T G T G T T T T T C T T T T C A C T A C A G T G G C C A A G A A A A A T G
```

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

```
G T A T G C A G G A T A C A T C A C C G A C A A G C A T A C A A T C C C A C A T  
G T A T G C A G G A T A C A T C A C C G A C A A G C A T A C A A T C C C A C A T  
80
```

Séquence témoin

```
G T A T G C A G G A T A C A T C A C C G A C A A G C A T A C A A T C C C A C A T
```

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

```
T G A T T C A A T C C A T T C T C C G C A T A G C A C A C G G A A C A C A A T C  
T G A T T C A A T C C A T T C T C C G C A T A G C A C A C G G A A C A C A A T C  
120
```

Séquence témoin

```
T G A T T C A A T C C A T T C T C C G C A T A G C A C A C G G A A C A C A A T C
```

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du gène KDR des moustiques traités

```
A T G A A G G A A T G C A T G A A A T C T G T A A A A T T C C A T C T T G G C A  
A T G A A G G A A T G C A T G A A A T C T G T A A A A T T C C A T C T T G G C A  
160
```

Séquence témoin

```
A T G A A G G A A T G C A T G A A A T C T G T A A A A T T C C A T C T T G G C A
```

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

```
G A T C A T G G T C G G G G A A T C T A T C C A C A T T A T C T G G A A A A A G  
G A T C A T G G T C G G G G A A T C T A T C C A C A T T A T C T G G A A A A A G  
200
```

Séquence témoin

```
G A T C A T G G T C G G G G A A T C T A T C C A C A T T A T C T G G A A A A A G
```

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TATATTAAGAAAAGGAAAAAAGCAATTAGGCTAGCAAAA
TATATTAAGAAAAGGAAAAAAGCAATTAGGCTAGCAAAA

240

Séquence témoin

TATATTAAGAAAAGGAAAAAAGCAATTAGGCTAGCAAAA

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

CACTGATTTTCTGATGAAATCTGTACAAAGCATTAAATT
CACTGATTTTCTGATGAAATCTGTACAAAGCATTAAATT

280

Séquence témoin

CACTGATTTTCTGATGAAATCTGTACAAAGCATTAAATT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités (moustiques pop. Nat.)

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TGCGTTTGTGAATATATAATAATTGAGAATAAGCTAGTAG
TGCGTTTGTGAATATATAATAATTGAGAATAAGCTAGTAG

320

Séquence témoin

TGCGTTTGTGAATATATAATAATTGAGAATAAGCTAGTAG

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

ACTACTTGAATTGATCATCAAGACATTGTAAGCTGTTTCT
ACTACTTGAATTGATCATCAAGACATTGTAAGCTGTTTCT

360

Séquence témoin

ACTACTTGAATTGATCATCAAGACATTGTAAGCTGTTTCT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

CTAACCTTTTTCTAAAAGCTTATCGTTAATGCATTTTCT
CTAACCTTTTTCTAAAAGCTTATCGTTAATGCATTTTCT

400

Séquence témoin

CTAACCTTTTTCTAAAAGCTTATCGTTAATGCATTTTCT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TTAACAGGGATTGCGTTGGCATTGTAAAGAGCATAATGCA
TTAACAGGGATTGCGTTGGCATTGTAAAGAGCATAATGCA

440

Séquence témoin

TTAACAGGGATTGCGTTGGCATTGTAAAGAGCATAATGCA

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TGTACATTGCAAATAATATAGTTACAAACCAATTGCAAGA

TGTACATTGCAAATAATATAGTTACAAACCAATTGCAAGA

480

Séquence témoin

TGTACATTGCAAATAATATAGTTACAAACCAATTGCAAGA

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

AAATTTTGGCTGATTTGGGC GAGACATTTTGT ACTTGTTG

AAATTTTGGCTGATTTGGGC AAGACATTTTGT ACTTGTTG

500

Séquence témoin

AAATTTTGGCTGATTTGGGC GGGCCTTTTTTTACTTGTTG

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TGTAAGTAGGTCATAGTAATTATAATAATATTAATAATGA

TGTAAGTAGGTCATAGTAATTATAATAATATTAATAATGA

560

Séquence témoin

TGTAAGTAGGTCATAGTAATTATAATAATATTAATAATGA

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TAGTAAAA TTTATCAACTCCA ATTGCTTTTTTATTTGCC

TAGTAAAA ATGTATCAACTCC ATTGCTTTTTTATTTGCC

600

Séquence témoin

TAGTAAAA TTTTTTCACTTCCATTGCTTTTTTATTTGCC

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

CATTTCTGTAAAGAAACAATAAGAATTTAGCAAATGCTCA

CATTTCTGTAAAGAAACAATAAGAATTTAGCAAATGCTCA

640

Séquence témoin

CATTTCTGTAAAGAAACAATAAGAATTTAGCAAATGCTCA

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TCAAATCAACCATTTCTTACAAATGATACATAAGCCACAG
TCAAATCAACCATTTCTTACAAATGATACATAAGCCACAG
680

Séquence témoin

TCAAATCAACCATTTCTTACAAATGATACATAAGCCACAG

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

ATAATTAGAGCTTAAAGCAATGTATGCAAGGATCAGAAAT
ATAATTAGAGCTTAAAGCAATGTATGCAAGGATCAGAAAT
720

Séquence témoin

ATAATTAGAGCTTAAAGCAATGTATGCAAGGATCAGAAAT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TAGCTTTGTTCTTTGATACTCTACCTTTAATTTACAGATT
TAGCTTTGTTCTTTGATACTCTACCTTTAATTTACAGATT
740

Séquence témoin

TAGCTTTGTTCTTTGATACTCTACCTTTAATTTACAGATT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

ATGACACTATATGTAAAAAATCATGTTTCGTCTAGAAAGT
ATGACACTATATGTAAAAAATCATGTTTCGTCTAGAAAGT
800

Séquence témoin

ATGACACTATATGTAAAAAATCATGTTTCGTCTAGAAAGT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

ACATCCTATAGAAGCTTACAGTATTTTCATGGATTTATTT
ACATCCTATAGAAGCTTACAGTATTTTCATGGATTTATTT
840

Séquence témoin

ACATCCTATAGAAGCTTACAGTATTTTCATGGATTTATTT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

TATTTATTTGTGTAATAAGCATTTGTCAACTATTCTTT
TATTTATTTGTGTAATAAGCATTTGTCAACTATTCTTT
880

Séquence témoin

TATTTATTTGTGTAATAAGCATTTGTCAACTATTCTTT

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

A A T T T T A T G T A A T T C T G T A A G C A T G G T T G C A A A A A A A G T A
A A T T T T A T G T A A T T C T G T A A G C A T G G T T G C A A A A A A A G T A

920

Séquence témoin

A A T T T T A T G T A A T T C T G T A A G C A T G G T T G C A A A A A A A G T A

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

T T T C A G G G G T T T C T G A A T A C A A T T T A C A T A G T T T G A T C T T
T T T C A G G G G T T T C T G A A T A C A A T T T A C A T A G T T T G A T C T T

960

Séquence témoin

T T T C A G G G G T T T C T G A A T A C A A T T T A C A T A G T T T G A T C T T

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

A T T T C A T T A A G A A T A A A T C C T A A T C A A A T G T A T G T T C C G T
A T T T C A T T A A G A A T A A A T C C T A A T C A A A T G T A T G T T C C G T

1000

Séquence témoin

A T T T C A T T A A G A A T A A A T C C T A A T C A A A T G T A T G T T C C G T

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

A C A C A A T G A A T C T C T T G T G T T T T A T A T A A A T A G T G T T G G C
A C A C A A T G A A T C T C T T G T G T T T T A T A T A A A T A G T G T T G G C

1040

Séquence témoin

A C A C A A T G A A T C T C T T G T G T T T T A T A T A A A T A G T G T T G G C

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

T T G A A T G G T G C T T A T T A C C A C A T T T A T G C G C G G A T G C A G T
T T G A A T G G T G C T T A T T A C C A C A T T T A T G C G C G G A T G C A G T

1080

Séquence témoin

T T G A A T G G T G C T T A T T A C C A C A T T T A T G C G C G G A T G C A G T

Séquence du gène KDR des moustiques non traités

Séquence du Gène KDR des moustiques traités

G C T C A **C T A C T T A C C G A C A T A G T T C T T T C C**
G C T C A

2000

Séquence témoin : G C T C A

En comparant ces deux séquences, nous notons des différences dans les bases entre les populations naturelles de *Culex quinquefasciatus* et celles traitées après 24 heures au niveau des positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 et 17. Ces différences sont aussi visibles au niveau des positions 569, 571, 572, 573, 574, 575, 577, 578, 579, 582 et au niveau des positions 602, 603, 604, 605. Avant et après la position 1090 paires de bases, la séquence nucléotidique du gène kdr des populations de moustiques traités est plus longue que celle des moustiques de la population naturelle non traitée.

L'analyse synthétique des séquences nucléotidiques a donné les tableaux 12 et 13 suivants:

Tableau 12: récapitulatif des génotypes des moustiques traités et naturels de *Culex quinquefasciatus*.

	Différences dans les génotypes	Fréquences
	moustiques traités et moustiques naturels	
Espèce : <i>Culex quinquefasciatus</i>	A/G	3
	G/A	5
	G/C	1
	C/G	1
	A/T	1
	T/A	5
	T/C	4
	C/T	2
	C/A	5
	A/C	2
	G/T	2
	T/G	1

Tableau 12: fréquence des allèles

Echantillons	Nombre	la source nucléotidique	Fréquence des allèles	Constats
			<u>TTA</u> / <u>T</u> <u>TTT</u> / <u>TTA</u>	Modification du génotype d'un leu à Phe, kdr résistance
<i>Cx quinq.</i> traités et	1	ADN	1 5	une seule modification nucléotidique

naturels				
"	"	"	<u>ACG/GAC</u> <u>ACT/TGA</u>	
"	"	"	1	1
"	"	"	<u>GAA/ATT</u> <u>ACG/GAC</u>	
"	"	"	2	3
"	"	"	<u>TTC/CCC</u> <u>CTA/TAT</u>	
"	"	"	4	2
"	"	"	<u>ACG/GAC</u> <u>ATT/CAT</u>	
"	"	"	5	2
"	"	"	GTA/TGT	TAA/GTA
"	"	"	2	1

V.4. DISCUSSION

La détermination de l'insensibilité voire de la résistance des moustiques *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1% (biopesticide local) a révélé par électrophorèse une amplification du gène kdr du canal sodium voltage dépendant au niveau des populations naturelles de *Culex quinquefasciatus* génération zéro (DSenCq G0) à 1000 pb, puis au niveau des populations traitées et mortes après 24 heures génération 1 (DSenCqG1) à 1000 pb et aussi au niveau des populations insensibles voire « résistantes » au Suneem après cinq générations G5 (DSenCqG5) à 1200 pb. Ces résultats obtenus avec *Culex quinquefasciatus* dans cette étude ne sont pas conformes avec ceux de Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) qui ont trouvé une amplification du gène kdr du canal sodium voltage dépendant à 125 pb pour les moustiques d'*Aedes aegypti* résistants aux pyréthrinoides.

Par ailleurs, les séquences nucléotidiques obtenues à partir des populations naturelles (*Culex quinquefasciatus* non traités par le Suneem 1%) (DSenCqG0) et de celles traitées et mortes après 24 h ont montré des différences dans la succession des bases au niveau des positions 1 à 17 et des positions 602 à 605. Leur analyse a montré une mutation suite à un remplacement d'une base la thymine par une autre l'adénine. Cette mutation va être à l'origine du remplacement d'une leucine (TTA) par une phenylalanine (TTT). Cette mutation pourrait être à l'origine d'une insensibilité voire même d'une « résistance » des moustiques du genre *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%. Ces résultats sont similaires à ceux des travaux de Singh *et al.*

(2011). En effet, les travaux de Singh *et al.* (2011) ont révélé la présence de 2 mutations alternatives non synonymes entre (T et C) et (A et T) respectivement au niveau de la 2^{ème} et de la 3^{ème} position du codon. Ce qui est à l'origine d'une mutation d'une Leucine (TTA) par une Serine (TCA) et par une Phénylalanine (TTT). Cette mutation est à l'origine d'une résistance kdr (knock down resistance) survenue après modification du canal sodium voltage dépendant. Cette insensibilité voire une résistance d'une partie des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées pourrait être expliquée par une pression de sélection des pesticides utilisés dans le cadre des campagnes de démoustication organisés par l'Etat du Sénégal. Cette explication trouve son explication dans les résultats de Sinègre *et al.* (1976) qui stipule que l'insensibilité voire la résistance des populations de Culicidae est due à la pression de sélection des pesticides agricoles auquel les biotopes périurbain, urbain et rural de *Culex pipiens* sont soumis.

Par ailleurs, le canal sodium voltage dépendant est le premier site où agissent la plupart des insecticides surtout les biopesticides (Narahashi, 1996 et Sattelle *et al.*, 1998). Les résultats de cette étude viennent une fois de plus étayer et confirmer les résultats de Narahashi (1996) et Sattelle *et al.* (1998) car les travaux d'extraction, d'amplification et de séquençage de l'ADN de *Culex quinquefasciatus* qui ont survécues aux traitements ont révélé une modification de la conformation du canal sodium voltage dépendant qui a été à l'origine de la résistance d'une partie des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées au Suneem après 5 générations (F5). Haubruge et Amichot (1998) ont dans leurs études mis au point les principaux mécanismes responsables de la résistance parmi lesquels la résistance comportementale associée à la mobilité du moustique, celui physiologique associé à la modification de la cinétique de pénétration, de séquestration et de l'excrétion des insecticide, et celui biochimique associé à l'activation des systèmes de détoxification. Les résultats de cette étude sont en phase avec un mécanisme décrit par Haubruge et Amichot (1998) c'est à dire le mécanisme de résistance physiologique associée à la modification de la cinétique de pénétration. Dans ce mécanisme le plus souvent, le gène Kdr peut être surexprimé et les protéines synthétisées empêchent l'insecticide de tuer les moustiques par effet knock-down.

Knipple *et al.*, 1994 et Williamson *et al.*, 1993 ont dans leurs travaux sur les mouches mis en évidence une mutation correspondant à une substitution d'une leucine par une phénylalanine (Leu à Phe) résultant d'une seule polymorphisme nucléotidique. Cette mutation correspond à une

résistance de type kdr. Les résultats de Knipple *et al.* (1994) et Williamson *et al.* (1993) sont similaires à ceux de cette étude. Les résultats les plus récents confirment les plus anciens.

V.6. CONCLUSION

L'étude réalisée sur une partie des larves de *Culex quinquefasciatus* qui ont survécues aux traitements du Suneem après plusieurs générations a révélé une résistance due à la modification du gène kdr. Cette mutation s'est faite par le remplacement d'une leucine (TTA) par une phenylalanine (TTT). La modification de la conformation de ce gène est à l'origine de sa surexpression et donc d'une modification du canal sodum voltage dépendant qui est un des premiers cibles des insecticides et biopesticides.

**CONCLUSION GENERALE PERSPECTIVES
ET RECOMMANDATIONS**

VI.1. CONCLUSION GENERALE

Le travail présenté dans ce mémoire a porté sur l'étude de la sensibilité et de la résistance des larves de *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%.

Dans le chapitre III, nous avons analysé la sensibilité du *Culex quinquefasciatus* au niveau des oeufs, des stades jeunes (stades 1 et 2) et des stades âgés (stades 3 et 4) après 24, 48 et 72 heures de traitement.

Dans le chapitre IV, nous avons étudié les effets histopathologiques du Suneem 1% sur les larves de *Culex quinquefasciatus* après 24 heures de traitement.

Et enfin dans le chapitre V, nous avons mis en évidence une mutation du gène kdr responsable d'une insensibilité ou d'une résistance des moustiques *Culex quinquefasciatus* au Suneem 1%.

La sensibilité du *Culex quinquefasciatus* au suneem 1%

La sensibilité du *Culex quinquefasciatus* aux biopesticides à base de neem en général et au Suneem 1% en particulier est dépendant de la concentration en azadirachtine utilisée mais aussi de la durée.

L'analyse des résultats après 24 heures de traitement a permis de noter qu'à la plus petite concentration utilisée, beaucoup d'oeufs de *Culex quinquefasciatus* éclosent et qu'à la plus grande concentration, on note moins d'oeufs qui éclosent. Et par conséquent, on peut retenir que plus cette concentration en Suneem 1% augmente et plus le taux d'éclosion des oeufs de *Culex quinquefasciatus* diminue.

L'évolution de la mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* des stades jeunes (stades 1 et 2) et âgés (stades 3 et 4) est presque similaire à celle du taux d'éclosion des oeufs. En effet, plus la concentration en azadirachtine augmente plus la mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* augmente significativement. Par exemple, après 24 heures de traitement les larves de stades jeunes meurent à 8% à 2 mg/l d'azadirachtine. Mais quand la concentration atteint 12 mg/l, les larves de stades 1 et 2 meurent à 50%. Et à 18 mg/l (la plus grande concentration utilisée), les larves meurent à 90%. Le traitement après 48 heures a aussi donné des résultats similaires en termes d'évolution de la mortalité.

Tout ceci permet de conclure que le biopesticide (Suneem 1%) est efficace contre les larves et les oeufs de *Culex quinquefasciatus*, et aussi corrélativement contre les autres genres de moustiques à savoir Anophèle et Aedes. Les coupes histopathologiques observées au microscope photonique

et électronique le prouvent bien. On observe de manière nette et évidente la destruction des cellules, et partant de tout l'épithélium intestinal par l'azadirachtine à l'origine de la mort des larves.

La résistance du *Culex quinquefasciatus* au suneem 1%

Il apparaît aussi dans cette étude qu'après plusieurs traitements des larves certaines d'entre elles sont parvenues à développer une sorte de résistance face au Suneem et cela après 5 générations. La méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis d'amplifier le gène kdr responsable de cette résistance à 1200 pb. Le séquençage de ce gène a montré une mutation se traduisant par un remplacement d'une Leucine par une phenylalanine. Ceci correspond à une résistance de type kdr. Le canal sodium voltage dépendant (CNaVd) a été modifié dans sa conformation originelle. Tout ceci pour retenir qu'il y a lieu de prendre en compte le phénomène de la résistance quand on se décide de traiter les moustiques avec aussi bien avec les insecticides chimiques qu'avec certaines biopesticides qui ont aussi une composante chimique comme le Suneem 1%. Cette résistance le plus souvent apparaît dans des zones où la pression de sélection est importante quel qu'en soit l'insecticide.

VI.2. PERSPECTIVES

A l'issue de ses travaux, il serait important d'élargir la sensibilité et la résistance aux biopesticides à base de neem (comme le Suneem 1%) sur les autres espèces de vecteurs de maladies mais aussi et surtout de faire des traitement dans les gîtes potentiels de moustiques à grande échelle dans toutes les régions du Sénégal pour prévenir les maladies vectorielles.

VI.3. RECOMMANDATIONS

- Aux populations:

Ils doivent procéder par tous les moyens de diminuer et même d'éradiquer les moustiques soit par des méthodes mécaniques (remblayage, destruction de gîtes), soit utiliser des biopesticides à des concentrations raisonnables données par les chercheurs pour traiter les gîtes.

- Aux Etats:

Ils doivent développer des micro-industries de fabriques de biopesticides locales dans chacune des régions et instituer des groupes sentinelles de veille capables de traiter les gîtes des moustiques en temps réel et développer la prévention.

- Aux scientifiques:

Ce modeste travail de recherche pourrait être un jalon vers des productions scientifiques plus soutenues dans les domaine du contrôle des vecteurs de maladies par des biopesticides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbot W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.

Aliero B.L. 2003. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. *African Journal of Biotechnology*, **2** (9): 325-327.

Al-Mehmadi R.M., Al-Khalaf A.A. 2010. Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of King Saud University (Science)*. **22**, 77-85.

Al-Sharook, Z., Balan, K., Jiang, Y., Rembold, H., 1991. Insect growth inhibitors from two tropical meliaceae. Effect of crude seed extracts on mosquito larvae. *J. Appl. Ent.* **111**, 425-430.

Amichot M., Castella C., Cuany A., Berge JB., Pauron D. 1992. Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **44**, p. 189–190.

Anonyme 1979. La fièvre-jaune en 1978 et Fièvre-jaune de brousse. *Rel. Epidémiol. Hebd. OMS*, **54** (40) : 305-309.

Aouinty B., Oufara S., Mellouki F. & Mahari S. 2006. Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10** (2): 67-71.

Apperson C.S. and Georghiou G.P. 1975. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, **68** (2): 153-157.

Ayad H., Georghiou GP. 1975. Resistance to organophosphorate and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *J. Econ. Entomol.* **68**, p. 295–297.

Azmi M.A., Naqvi S.N.H., Ahmad I., Tabassum R. & Anbreen B. 1998. Toxicity of Neem Leaves Extract (NLX) compared with Malathion (57 E.C.) against late 3rd instar larvae of *Culex fatigans* (Wild Strain) by WHO Method. *Tr. J. of Zoology*. **22**: 231-218.

Barnard D.R. and Rui-De-Xue. 2004. Laboratory Evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. **41** (4): 726-730.

Batabyal L, Sharma P, Mohan L, Maurya P, Srivastava CN. 2009. Relative toxicity of neem fruit, bitter gourd, and castor seed extracts against the larvae of filaria vector, *Culex quinquefasciatus* (Say). *Parasitology Research*, **105**(5):1205-1210.

Batra C.P., Mittal P.K., Adak T. & Sharma V.P. 1998. Efficacy of neem oil-water emulsion against mosquito immatures. *Indian J. Malariol.*, **35** (1): 15-21.

Beckage N.E., Marion K.M., Walton W.E., Margaret C.W. & Tan F. F. 2004. Comparative larvicidal toxicities of three ecdysone agonists on the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles gambiae*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **57**: 111-122.

Beehler J.W. 1995. Effects of organic enrichment on temporal distribution and abundance of culicinae egg rafts. *Journal of the American Mosquito Control Association*. **11** (2 Part 1): 167-171.

Besansky N. J., Powell J. R., Caccone A., Hamm M. D., Scott J.A., and Collins F.H.1994. Molecular phylogeny of *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. **91** : 6885-6888.

Bourguet D., Raymond M., Berrada S., Fournier D. 1997. Interaction between acetylcholinesterase and choline acetyltransferase – a hypothesis to explain unusual toxicological responses. *Pestic. Sci.* **51**, p. 276–282.

Brown A.W.A., Abeni Z.H. 1960. Cross resistance characteristics of a Malathion tolerant strain developed in *Aedes aegypti*. *Mosq. News*, **23** (4): 341-345.

Brun A., Cuany A., Le Mouel T., Bergé JB., Amichot M. 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P-450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, p. 697–703.

Cariño FA., Koener JF., Plapp FW., Feyereisen R. 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P-450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, p. 411–418.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* **57**: 397–409.

Cavados C.F.G., Majerowicz S., Chaves J.Q., Araújo-Coutinho C.J.P.C., Rabinovitch L. 2004. Histopathological and ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Simulium pertinax* larvae (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **99** (5) : 493-498.

Cavalcanti, E.S.B., de Morais, S.M., Ashley, A.L.M., William, P.S.E., 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memo rias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 541-544.

Chapman RF. 1969. Digestion and absorption. *The insects. Structure and fonction.* The English Universities Press LTD., chap. IV : 26-69.

Charles J.F. & De Barjac H. 1981. Histopathologie de l'action de la δ -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves de *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Bio Control*. **26** (2): 203-219.

Cioffi M. 1979. The morphology and fine structure of the midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue and Cell*. **11**: 467-479.

Colignon P., Haubruge E., Gaspar C. & Francis F. 2003. Effets de la réduction de doses de Formulations d'insecticides et de fongicides sur l'insecte auxiliaire non ciblé *Episyrphus balteatus* (Diptera : Syrphidae). *Phytoprotection*. **84** (3): 141-148.

Dagnogo M., Coz J. 1982. Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*. Activité larvicide de *B. sphaericus* sur quelques espèces et souches de moustiques. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. et Parasitol.* vol. XX (2) : 133-138.

De Barjac H. 1978. Un nouveau candidat à la lutte biologique contre les moustiques : *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Bio Control*. **23** (4): 309-319.

Deng Y., Palmer CJ., Casida JE. 1991. House fly brain G A B A receptors: target for multiple classes of insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, p. 60–65.

Devonshire A.L., Moore GD. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamates and pyrethroid resistance in peach-potato aphids. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18** : 235-246.

Diarrasouba F. 2003. Sensibilité des vecteurs du paludisme au DDT et aux pyréthrinoides de synthèse préconisés pour l'imprégnation au Mali. Thèse de Doctorat en Pharmacie à la FMPOS de l'Université de Bamako ; 1-115

Djogbénu L 2009. Lutte antivectorielle contre le paludisme et résistance des vecteurs aux insecticides en Afrique *Med Trop*, **69** : 160-164.

Dong k. 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown (kdr) resistance to pyrethroid insecticides in german cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**: 93-100.

Dua VK, Pandey AC, Raghavendra K, Gupta A., Sharma and Dash AP. 2009. Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*. **8**: 124 abstract.

Dyar H.G. & Knab F. 1906. The larvae of *Culicidae* classified as independant organisms. *Journal of the New-York Entomological Society*, **XIV** (4): p.169.

Edwards F.W. 1912. A synopsis of the species of African *Culicidae* other than *Anopheles*. *Bull. of Entomol. Research*. **3**: 1-53.

El Hag E.A., El Nadi A.H. & Zaitoon A.A 1999. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Phytother. Res.*, **13**: 338-392.

Faye O., 1987. Contribution à l'étude des anophelinae (Diptera : Culicidae) et de la transmission du Paludisme dans la zone du barrage anti-sel de Bignona (Ziguinchor, Sénégal). Thèse 3^{ième} cycle Biologie Animale. FST/ UCAD.pp 202.

Feyereisen R, Koenen JF, Farnsworth DE, Nebert DN 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1465- 1469.

ffrench-Constant RH. 1994. The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, p. 335–345.

ffrench-Constant RH., Streichen JC., Rocheleau TA . , Aronstein K., Roush RT. 1993. A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in Drosophila populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, p. 1957–1961.

Field LM., Devonshire AL., Tylersmith C. 1996. Analysis of amplicons containing the esterase genes responsible for insecticide in *Myzus persicae*. *Biochem. J.* **313**, p. 543–547.

Focks D.A., Haile D.G., Daniels E., & Mount G.A. 2003. Larval habitat diversity and ecology of *anophelinae* larvae in Eritrea. *J. Med. Entomol.* **40** (6): 921-929.

Fournier D., Bride JM., Hoffmann F., Karch F. 1992a. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.* **267**, p. 14270–14274.

Fournier D., Bride JM., Poirie M., Bergé JB., Plapp FW. 1992b. Insect glutathione S transferases: biochemical characterization of the major forms from housefliescontrol – a large scale field trial in Southern Mexico. *Pestic. Sci.* **51**, p. 375–382.

Fournier D., Mutero A. 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.* **108 c**, p. 19–31.

Franciosa H., Bergé JB. 1995. Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and G S T-2 families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, p. 311–317.

Gabe M., 1968. Techniques histologiques. Masson Ed., Paris.

Ganushkina L.A. &Vojtsik A.A. 1986. La résistance des larves de moustiques à des préparations bactériennes en fonction de leur espèce et de l'âge. *Méd. Parasitol.* **18** (6) : 55-58.

Gonzalez M.S. and Garcia E.S. 1992. Effect of azadirachtine on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of Triatomine insect vectors: long-term and comparative studies. *J. Invertr. Pathol.*, **60**: 201-205.

Guedes RNC., Kambhampati S., Dover BA., Zhu KY. 1997. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* populations from the United States and Brazil. *Bull. Entomol. Res.* **87**, p. 581–586.

Guerrero FD., Jamroz RC., Kammlah D., Kunz SE. 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*, identification of *kdr* and super-*kdr* point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, p. 745–755.

Hadis M., Lulu M., Mekonnen Y. & Asfaw T. 2003. Field Trials on the repellent activity of four plant products against mainly *Mansonia* population in western Ethiopia. *Phytother. Res.* **17**: 202-205.

Hama H., Iwata T. 1971. Studies on the inheritance of carbamate resistance in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. Relationships between insensitivity of acetylcholinesterase and crossresistance to carbamate and organophosphate insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* **13**, p. 190–202.

Haubruge E., Amichot M. 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2** (3): 161-174.

Haubruge E., Amichot M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Enviro.* **2** (3) : pp . 161-174.

Hopkins G.H.E. 1952. Clés des larves de *Culicidae* de la région Éthiopienne. Office de la Recherche Scientifique & Technique d’Outre-Mer, Laboratoire d’Entomologie du S.H.M.P. à Yaoundé. pp. 30.

Hughes PB., Mc Kenzie JA. 1987. Insecticide resistance in *Lucilia cuprina*: speculation, science and strategies. In Devonshire AL. *Combating resistance to xenobiotics: Biological and chemical approaches*. Chichester, UK: Horwood p. 162–177

Huguette de Barjac. 1987. Un nouveau candidat à la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biocontrol.* **23** (4): 309-319.

Hung C.-N., Lin T.-L. & Lee W.-Y. 2000. Morphology and ultrastructure of alimentary canal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (2) : The structure of the midgut. *Zoological Studies.* **39**(4) : 387-394.

Ibarra J.E., Del Rincón M.C., Orduz S., Noriega D., Benintende G., Monnerat R., Regis L., De Olivera M.F., Sanchez J., Peña G. and Bravo A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latina America with insecticidal activity against different mosquitoes species. *Applied and Environmental Microbiology.* **69** (9): 5269-5274.

Jang, Y.S., Kim, M.K., Ahn, Y.J., Lee, H.S. 2002. Larvicidal activity of Brazilian plants against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 23-26.

- Jenkins D.A., Dunkel F.V. & Gamby Toure K. 2003.** Storage temperature of neem Kernel extract: Differential effects on oviposition deterrence and larval toxicity of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Environ. Entomol.* **32** (6): 1283-1289.
- Jongsma MA., Bakker PL., Peters J., Bosch D., Stiekema WJ. 1995.** Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, p. 8041–8045.
- Karch S. & Coz J. 1983.** Histopathologie de *Culex pipiens* Linné (Diptera, Culicidae) soumis à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **XXI** (4) : 225-230.
- Kellen WR, Clark TB & Lindegren JE, Ho CB, Rogoff MH & Singer S. 1965.** *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J. Invert. Pathol.*, **7**: 442-448.
- Khan M.F. & Ahmed S.M. 2000.** Toxicity of crude neem leaf extract against housefly *Musca domestica* L. adults as compared with DDPV, Dichlorvos. *Urk. J. Zool.* **4**: 219-223.
- Klocke J. A. 1987.** Natural plant compounds useful in insect control. Extrait du livre : Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. Editions: American Chemical Society, Chap. **36**: 404-407.
- Knipple, D.C., Doyle, K.E., Marsella-Herrick, P.A., and Soderlund, D.M. 1994.** Tight genetic linkage between the kdr insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**; 2483–2487.
- Konan Y.L., Koffi A.A., Doannio J.M.C. & Darriet F. 2003.** Résistance de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) à la deltaméthrine et l'utilisation de la moustiquaire imprégnée en milieu urbain de Bouaké, Côte d'ivoire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **96** (2) : 128-129.
- Koua H.K., Han S.H., D'Almeida M.A. 1998.** Histopathologie de *Anopheles gambiae s.l.* Giles, 1902 (Diptera : Culicidae) soumis à l'activité larvicide de l'extrait aqueux de *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae). *Entomologie médicale. Bull. Soc. Path. Ex.* **91** (3) : 252-256.
- Kpegan A. & Quiot J.M. 1994.** Etude des propriétés insecticides de l'extrait de graines de neem, *Azadirachta indica*. Travaux universitaires de Thèse. Université de Montpellier 2, France. p. 94-96.
- Kuwahara M., Miyata T., Saito T., Eto M. 1982.** Activity and substrate specificity of the esterase associated with organophosphorus insecticide resistance in the Kanzawa spider mite *Tetranychus kanzawai*. *Appl. Entomol. Zool.* **17**, p. 82–91.
- Lewallen C.S., Nicholson LM. 1959.** Parathion resistant *Aedes nigromaculis* in California. *Mosq. News.* **19**: 12-14.

- Lina María Ruiz, César Segura, Judith Trujillo, Sergio Orduz. 2004.** In vivo binding of the Cry 11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 99 (1): 73-79.
- Lockwood J.A., Sparks T.C., Story R.N. 1984.** Evolution of insect resistance to insecticide: a reevaluation of the roles physiology and behaviour. Bull. Entomol. Soc. Am. **30**: 41-51.
- M.S. Williamson, I. Denholm, C.A. Bell, A.L. Devonshire. 1993.** Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*), Mol. Gen. Genet. 240 (1993) 17–22.
- Martoja R. & Martoja-Pierson M. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie. Paris, p.345.
- Martoja R. and Ballan-Dufrancais C. 1984.** The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In *Insect Ultrastructure* (eds R. C., King and H. Akai), vol.2: 199-268. Plenum Press. New York, London.
- Mattingly P.F. 1970.** Mosquito larvae. Mosq. Syst. Newsletter. **2**(1): 34-36.
- Mishra A.K., Singh N. & Sharma V.P. 1995.** Use of neem oil as a mosquito repellent in tribal villages of mandla district, madhya Pradesh. Indian J. Malariol. **32** (3): 99-103.
- Mouchès C., Pauplin Y., Agarwal M., Lemieux L., Herzog M., Abadon M., Beysat-Arworthy V., Hyrien O., de Saint-Vincent BR., Georghiou GP., Pasteur N. 1990.** Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, p. 2574–2578.
- Mouchet J., Elliot R., Gariou J., Voelckel J & Varrieras J. 1960.** La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied et les problèmes d'hygiène au Cameroun. Médecine tropicale. **20** (4): 448- 455.
- Mulla M.S. & Tianyun Su. 1999.** Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. J. Am. Mosq. Control. Assoc. **15** (2): 133-152.
- Narahashi T., 1996.** Neuronal ion channels as the target sites of insecticides ; Pharmacol. Toxicol. **78** : 1-14.
- Nasiruddin M. and Mordue (Luntz) A. J. 1993.** The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. Tissue and Cell. **25** (6): 875-884.
- Ndiaye Mansour 2010.** Etude de la sensibilité et de la résistance éventuelle des larves L4 de *Aedes Aegypti* à un produit de neem *Azadirachta indica* A JUSS: Contribution au contrôle du vecteur. Mémoire de DEA. FST UACD.

- Ndione R.D. 2004.** Étude de l'efficacité larvicide des extraits du neem *quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). UCAD, FST. Mem. DEA de Chimie et Biochimie des Produits Naturels. pp.59.
- Ndione R.D., Faye O., Ndiaye M., Dieye A. & Afoutou J.M. 2007.** Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica*, A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. Journal of African Biotechnology. **6**(24):2846-2854.
- Ndione R.D., Seye F., Ndiaye M. & Sow I. 2006.** Effets histopathologiques des produits du neem (*Azadirachta indica*, A. JUSS) sur les larves de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera : Culicidae). Dakar Médical **51**(2) : 107-112.
- Neveu-Lemaire M. 1902.** L'évolution de la classification des *Culicidae*. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. Ed. MASSON & C^{ie}, 120 Boulevard St-Germain, Paris (VI), **1** (1) : 91-107.
- OMS. 1979.** *Bacillus sphaericus* strain 1593-4. Doc mimeo, V.B.C. / BC / DS : 79-09.
- Oppenoorth FJ., Van Asperen K. 1960.** Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* **132**, p. 298–299.
- Park Y., Taylor MFJ., Fyereisen R. 1997.** A valine421 to methionine in IS6 of the HSCP voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **239**, p. 688–691.
- Pavela R 2007.** Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. *Pest Technol* **1**:47–52.
- Pavela R, Teixeira da Silva AJ. 2006.** New control technologies against pests based on azadirachtin. *Floricult Ornament Plant Biotechnol* **3**: 564–566.
- Pavela R, Vrchotová N (2013).** Insecticidal effect of furanocoumarins from fruits of L. Against larvae *Spodoptera littoralis* Bois. *Angelica archangelica*. *Ind. Crops Prod.* **43**:33-39.
- Pavela Roman 2009** The Effects of Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Traditional Extraction Techniques on Larvae *Leptinotarsa decemlineata* SAY. *J. Essent. Oil Res.*, **21**: 1-7.
- Philogène B.J.R. 1991.** L'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes : problèmes et perspectives. In: « la lutte anti-acridienne »; (Ed. Aupelf-Uref): 269-278. John Libbey Eurotext. Paris.
- Pittendrigh B., Aronstein K., Zinkovsky E., Andreev O., Campbell B., Daly J., Trowell S., French-Constant RH. 1997.** Cytochrome P-450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethroid –susceptible and– resistant strain. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, p. 507–512.

Pushpalatha E. & Muthukrishnan J. 1999. Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes. *Journal of Applied Entomology*. **123** (6): 369; Abstract.

Raccoud J.S. 1991. Les insectes, physiologie développement. Masson, Paris, 1980, 276 p.

Raguraman S. & Singh R.P. 1999. Biological effects of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on an egg parasitoid, *Trichogramma chilonis*. *J. of econ. Entomol.* **92** (6): 1274-1280.

Rajkumar S., Jebanesan A. 2005. Scientific Note: Oviposition deterrent and skin repellent activities of *Solanum trilobatum* leaf extract against the malarial vector *Anopheles stephensi*. *Journal of Insect Science*, **5** (15): 3 pp.

Ravindran J., Eapen A. & Kar I. 2002. Evaluation of repellent action of neem oil against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Indian J. Malariol.* **39** (1-2): 13-17.

Raymond M., Fournier D., Bergé J.B., Cuany A., Bride J.M., Pasteur N. 1985. Singh-mosquito test to determine genotypes with an acetylcholinesterase insensitive-resistant to inhibition to propoxur insecticide. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **1**: 425-427.

Reeves W.K. 2004. Mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in snow-melt pools in a Swedish Lapland area. *J. of Vector Ecol.* **29** (1): 109-123.

Rey D., Long A., Pautou M.P. and Meyran J.C. 1998. Comparative histopathology of some diptera and crustacea of aquatic alpine ecosystems after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* **88** (3): 255-263.

Rodhain F. & Perez C. 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire : Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. *Meloine S.A*

Rost M.M., Kuczera M., Malinowska J., Polak M., Sidor B. 2004. Midgut epithelium formation in *Thermobia domestica*(Packard) (Insecta, Zygentoma). **37** (2005): 135-143.

Roth M.1980. Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes. Document. Tech. O.R.S.T.O.M. (Paris). **23**: 1-332.

Ruas-Neto A.L., Silveira-Am S. & Da-Ac-colares E. 1994. Mosquito controls based on larvicides in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: Choice of the control Agent. *Cad. Saúde Públ.* **10** (2): 222-230.

Ruiz L.M., Segura C., Trujillo J., Orduz S. 2004. In vivo binding of the cry 11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp.*medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99** (1):73-79.

Saavedra-Rodriguez K., Urdaneta-Marquez L., Rajatileka S., M. Moulton*, A. E. Flores, I. Fernandez- Salas, J. Bisset, M. Rodriguez, P. J. McCall, M. J. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway and W. C. Black IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* **16** (6): 785–798.

Sahar AB Fallatah 2010. Histopathological Effects of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*) Extracts on the larvae of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. JASMR, **5** (2): 123-130.

Sakar M., Borkotoki A., Baruah I., Bhattacharyya I.K. et Srivastava R.B. 2009. Molecular analysis of knock down resistance (kdr) mutation and distribution of kdr genotypes in a wild population of *Culex quinquefasciatus* from India. *Parasitology Research*, **14** (9):1097-1104.

Sattelle D.B., Yamamoto D.1998. Molecular targets of pyrethroid insecticides. *Adv. Insect. Physiol.* **20**: 147-213.

Scott M. & Kaushik N.K. 2000. The toxicity of a neem insecticide to populations of *Culicidae* and other aquatic invertebrates as assessed in *In Situ* Microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39** : 329-336.

Selladurai Subarani., *Selvisabhanayakam., Chinnaperumal Kamaraj. 2012. histological and larvicidal effects of aqueous and synthesized silver nanoparticles using leaf extracts of *Vinca rosea* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* say larvae (Diptera: Culicidae). *International Journal of Current Research* Vol. 4, Issue, 10, pp.304-315.

Seye F. 2004. Test d'efficacité des produits de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) comparés à la Deltaméthrine sur les larves et nymphes de moustique (*Culex quinquefasciatus*), étude histopathologique. UCAD, FST. Mem. de DEA de Chimie et Biochimie des Produits Naturels. pp. 49.

Seye F. 2006 . Contrôle du développement des moustiques par l'utilisation des produits naturels (produits de neem et champignons) et étude comparative avec deux produits chimiques de synthèse (Deltaméthrine et Fénirothion). UCAD, FST. Mem. de Thèse de 3^{ème} Cycle de Biologie Animale n° 074 pp. 178.

Seye F., Ndione R. D., Ndiaye M. 2006 a. Effets larvicides des produits de neem (Huile de neem pure et Neemix) comparés à deux insecticides chimiques de synthèse (la Deltaméthrine et Fénirothion) sur les larves de moustiques *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). *Journal des Sciences et Technologies.* **4** (1) : 27-36.

Seye F., Ndione R.D. et Ndiaye M. 2006 b. Étude comparative de deux produits de neem (Huile et Poudre) sur les stades préimaginaux de moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). *Afrique Science.* **02** (2): 212-225.

Sharma P, Mohan L, Srivastava CN 2009. Anti-juvenile activity of *Azadirachta indica* extract on the development and morphometry of filaria vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say. *Parasitology Research*, **105**(5):1193-1203.

Sharma S.k. & Dua V.P. 1995. Field studies on the repellent action of neem oil, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public health* **26** (1995): 180-182.

- Shililu J., Ghebremeskel T., Seulu F., Mengistu S., Fekadu H., Zerom M., Ghebregziabiher A., Sintasath D., Bretas G., Mbogo C., Githure J., Brantly E., Novak R. & Beier J.C. 2004.** The practical importance of permanent and semipermanent habitats for controlling aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu lato* mosquitoes: operational observations from a rural town in western Kenya. *Tropical Medicine & International Health*. **9** (12): 1274-1289.
- Siddiqui B.S., Afshan F., Ghiasuddin, Faizi S., Naqvi S.N.H & Tariq R.M. 2000.** Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*. **53** (2000): 371-376.
- Sinegre G., Jullien J.L. & Crespo O. 1976.** Résistance de certaines populations de *Culex pipens* (L) au Chlorpyrifos (DursbanR) en Languedoc-Roussillon (France). *Cah. O.R.S.T.O.M., Sér. Ent. Méd. Et Parasitol.*, vol. **XIV**, n°1:49-59.
- Singh O.P., Dykes C.L., Lather M., Agranat O.P. & Adak T. 2011.** Knockdown resistance (kdr)-like mutations in the voltage-gated sodium channel of a malaria vector *Anopheles stephensi* and PCR essays for their detection. *Malaria journal*. **10**:5-9
- Singh S. 2003.** Effects of aqueous extracts of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. **127** (9-10): 540-547.
- Sivagnaname N., Kalyanasundaram M. 2004.** Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlanta monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stage of mosquitoes and non-target organisms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **99** (1): 115-118.
- Smissaert HR. 1964.** Cholinesterase inhibition in spidermites susceptible and resistant to organophosphorus. *Science* **143**, p. 129–131.
- Soderlund D.M., Knipple D.C. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides, *Insect Biochem Mol Biol*. **33**: 563-577.
- Syafuruddin, Arakawa R., Kamimura K. & Kawamoto F. 1990.** Histopathological effects of insect growth regulator, 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) pyrol ether (pyriproxyfen), on the larvae of *Aedes aegypti*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* vol. **41** (1): 15-22.
- Syafuruddin, Ryo Arakawa, Kiyoshi Kamimura and Fumihiko Kawamoyo. 1990.** Histopathological effects of an insect growth regulator, 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pirydyloxy) propyl ether (pyriproxyfen), on the larvae of *Aedes aegypti*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **Vol. 41** N°1: 15-22.
- Tawatsin A., Wratten D.S., Scott R.R., Thavara U. and Techadamrongsin Y. 2001.** Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology*. **26** (1): 76-82.

Thompson M., Steichen JC., French-Constant RH. 1993. Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect Mol. Biol.* **2**, p. 149–154.

Tianyun Su M.S. & Mulla Mir M. 1999. Oviposition bioassay responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* to neem products containing azadirachtin. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* **91** (2): 337 (Abstract).

Tianyun Su M.S. & Mulla Mir S. 1998. Ovicidal activity of neem products (Azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **14** (2): 204-209.

Tomita T., Scott JG. 1995. cDna and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P-450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, p. 275–283.

Tripathi RK., O'Brien RD. 1973. Insensitivity of acetylcholinesterase as a factor in resistance of houseflies to the organophosphate Rabon. *Pest. Biochem. Physiol.* **6**, p. 30–34.

Tyrell J.D., Davidson L.I., Bulla L.A. Jr and Ramoska W.A. 1979. Toxicity of Parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology.* **38** (4): 656-658.

Van Rie J., Mc Faughey WH., Johnson DE., Barnett BD., Van Mellaert D. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **247**, p. 72–74.

Vatandoost H, Vaziri VM 2004. Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran Eastern Mediterranean Health Journal. **10** (4-5):573-581.

Wandscheer C. B., Duque J.E., Da Silva M.A.N., Fukuyama Y., Wohlke J.L., Adelman J. and Fontana J.D. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon.* **44** (4): 829-835.

Waters LC., Zelhof AC., Shaw BJ., Chang LY. (1992). Possible involvement of a long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P-450 gene in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, p. 22–27.

Whyard S., Downe AER., Walker VK. 1994a. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, p. 819–827.

Whyard S., Russell R.J., Walker VK. 1994b. Insecticide resistance and malathion carboxylesterase in *Lucilia cuprina*. *Biochem. Genet.* **32**, p. 9–24.

Williamson MS., Martinez-Torres D., Dick CA., Devonshire AL. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* **252**, p. 51–60.

Wilson M.D., Akpabey F.J., Osei-Atweneboana M.Y., Boakye D.A., Ocran M., Kurtak D.C., Cheke R.A., Mensah G.E., Birkhold D. and Cibulsky R. 2005. Field and laboratory studies on water conditions affecting the potency of Vectobac® (*Bacillus thuringiensis* serotype H-14) against larvae of the backfly, *Simulium damnosum*. *Medical and Veterinary Entomology* **19**: 404-412.

Wiseman, Z. & Chapagain, B.P. (2006). Larvicidal activity of saponin containing extracts and fractions of fruit mesocarp of *Balanites aegyptiaca*. *Fitoterapia* **77**: 420–424.

Xu Qiang, Wang Haichuan, Zhang Lee and Liu Nannan. 2006. Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.) *Pest Manag Sci* **345**:774–780.

Xu Qiang, Wang Haichuan, Zhang Lee and Liu Nannan. 2011. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance *Pest Manag Sci* **61**:1096–1102.

Yarbrough JD., Roush RT., Bonner JC., Wise DA.1986. Monogenic inheritance of cyclodiene insecticide resistance in mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Experientia* **42**, p. 851–853.

Yebakima A., Schutch G., Vernerey M. et Mouchet J. 1979. Situation d'*Aedes aegypti* en Martinique et considération sur la stratégie de lutte. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. et Parasitol.*, vol. **XVII** (4) : 213-219.

Zaazou MH., Ali AM., Abdallah MD., Riskallah MR. 1973. In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase and aliesterase in susceptible and resistant strains of *Spodoptera littoralis*. *Bull. Entomol. Soc. Egypt. Econ.* **7**, p. 25–30.

Zhu KY., Clark M. 1993. Purification and characterization of acetylcholinesterase from *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, p. 245–251.

WEBOGRAPHIE

www.infectiologic.com/seminaires-desc-2004/Janvier-0401-maladies-vectorielles-Pickard

<http://www.mosquito.org/mosquito-information/biology.aspx>

www.wikipedia.org/mosquito

http://fr.wikipedia.org/wiki/Signification_statistique

www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/fr/

ANNEXES

ANNEXE 1

Topclass Journal of Herbal Medicine Vol. 2(3) pp. 43-58, 26 March, 2013

Available online at <http://www.topclassglobaljournals.org>

ISSN 2315-8840 ©2013 Topclass Global Journals

Submitted 30/01/13 Accepted 12/02/13

Full Length Research Article

Larvicidal and cytopathologic effects of Suneem 1% (neem: *Azadirachta indica*, A. Juss, Meliaceae) on mosquitoes vectors of diseases

Raymond Demba Ndione^{1*}, Mady Ndiaye¹, Omar Faye², José Marie Afoutou², Aboulaye Dieye³

¹ Cheikh Anta Diop University of Dakar, Faculty of Sciences and Techniques, Department of Animal Biology, Laboratory of Biology of the Reproduction, Unity of Entomology, Rickettsiology, Bacteriology and Virology (UERBV) BP 5005 Dakar Senegal

² Cheikh Anta Diop University of Dakar, Faculty of Medicine, Pharmacy and odontostomatology, histology, embryology and cytogenetics laboratory, Fann-Senegal. BP 5005 Dakar

³ Senchim, Chemical Industry group of Senegal, 13 Km Rufisque BP 21236 Dakar Senegal

Abstract

The fight against biolarvicide is a strategy used to eradicate mosquito larva. The main objective of this study is to screen the extract of neem so as to discover the larvicidal and histopathological effects of Suneem 1% on *Anopheles gambiae s.l.* and *Culex quinquefasciatus* larva. To achieve this objective, third and/or fourth instars larvae of *Anopheles gambiae s.l.* or *Culex quinquefasciatus* were exposed to different concentrations 2, 4, 6, 8 and 10 mg/l. The control larvae were immersed in water with solvent (TetraHydroFurfuryl Alcohol: THFA®). 50% of the mortality at 4 mg/l (CL50) after 24 h for *Culex quinquefasciatus* and at 6 mg/l after 120 h for *Anopheles gambiae s.l.* was recorded. The pictures of histopathological effects reveal at light microscopic the non-uniform epithelial cell layer, a disruption of cell of the midgut and necrosed cells. At electron microscopy level the disappearance of cellular organelles was observed, also there was less homogeneous cytoplasm and a significant vacuolisation. Suneem 1% has larvicidal effects on *Anopheles gambiae s.l.* and *Culex quinquefasciatus*.

Key words: Suneem 1%, mosquito larvae, larvicidal effects, CL50 and CL90, histopathological effects.

INTRODUCTION

Mosquitoes (*Aedes*, *Anopheles* and *Culex*) are vectors of many viruses, bacteria and filarial. They are responsible for many diseases like filariasis, arbovirus (*Culex quinquefasciatus*), yellow fever, dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles gambiae s.s.*). Mosquitoes also cause a lot of damages. In Senegal, the Ministry of health and its services including those of vector control use chemical insecticides such as deltamethrin, fenitrothion and others to reduce mosquito bites and as such prevent diseases. Despite their effectiveness against mosquitoes, chemical insecticides have some disadvantages such as pollution, toxicity of residues to the non-target organisms and resistance (Su and Mulla, 1999). Control of mosquito vectors conciliate the efficiency and the specificity of the insecticide used and also the environmental conservation. To find new modes of action and to develop active agents based on natural plant products, efforts are made to develop phytochemical insecticides. Neem (*A. indica*, A. Juss) is known as biopesticide having larvicidal properties on mosquitoes (Su and Mulla, 1999). Neem products have shown a wide range of effects against mosquitos including antifeedancy and repellency (Mishra et

al, 1995; Lucantoni et al, 2006; Ravindran et al, 2002), toxicity (Azmi et al, 1998; Batra et al, 1998; Scott and Kaushik, 2000, Ndione et al, 2007), ovicidal activity (Su and Mulla, 1999), fecundity

Ndione et al., 2013Topcls. J. Herb. Med. 2(3) p.44

suppression (Su and Mulla, 1998; Su and Mulla, 1999) and insect growth regulation (Okumu et al, 2007). Neem products showed histopathological effects on the midgut. Cells are hypertrophied and degenerated, they are also necrosed (Ndione et al, 2006; Seye et al, 2006). In this study, the main objective is to screen the biopesticides based on neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) to determine their effectiveness on mosquito vectors related diseases. The study also seeks to examine the extent to which they are environmentally friendly and cheap to afford. Specifically the study aims to determine the following: (a) The lethal concentrations 50 and 90 (CL 50 and CL 90) of Suneem 1% to *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae s.l.*, (b) The evolution of Suneem 1% effectiveness with the dose-response curve, (c) How Suneem 1% and other biopesticides kill mosquitoes by determining the histopathological effects.

MATERIAL AND METHODS

Experimental insect

The larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) derived from eggs were collected in the artificial habitats of the Department of Animal Biology of Cheikh Anta Diop University campus of Dakar and in the surrounding areas. After 24 to 48 h hatch of eggs in distilled water, *Culex quinquefasciatus* larvae was obtained. The larvae were reared with bread powder under the laboratory conditions (Temperature: 25°C and Relative Humidity: 75%). *Anopheles gambiae s.l.* larvae were provided by the Institut Pasteur of Dakar, Senegal.

A neem product: Suneem 1%

Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss) was formulated by SENCHIM's industry. Suneem 1% was manufactured from pure neem oil by adding a surfactant, a solvent (the TetraHydroFurfuryl Alcohol: THFA®) and a technical neem powder. The manufacturing procedure was provided by the SENCHIM 1.

Larval toxicity bioassay

The testing procedure was made using 5 plastic containers that measure 10 x 10 x 7cm. 5 different concentrations of 1% Suneem were used: 2, 4, 6, 8 and 10 mg/l. Each plastic contained 500 ml of distilled water. 50 larvae of *Culex quinquefasciatus* or *Anopheles gambiae s.l.* were counted and immersed in each plastic container. Each container was subjected to the 1% Suneem concentrations 2, 4, 6, 8 and 10 mg/l between 24 to 120 h, a photoperiod of 12/12 h light/dark cycle, a range of temperature from 25°C to 30°C and 80% RH (Relative Humidity). Bread powder was mixed with water into each plastic container as food of *Culex quinquefasciatus* or *Anopheles gambiae s.l.* during the tests. Each test was repeated three times. As control, *Culex quinquefasciatus* or *Anopheles gambiae s.l.* larvae were treated with 0.01 ml of TetraHydroFurfuryl Alcohol: THFA® (solvent).

Correction of primary mortality

Percentage mortality recorded was corrected with Abbott's formula (Abbott, 1925):

$$\text{Corrected mortality (\%)} = \frac{\% \text{ mortality of test} - \% \text{ control mortality} \times 100}{100 - \% \text{ control mortality}}$$

Statistical analyses

The result of bioassays conducted in the laboratory were analyzed with Anova-test with a significance level $\alpha = 0.05$.

Electron microscopy

The samples (moribund, dead and control) larvae were cut into small sections. They were fixed within 1 h in the 2.5% glutaraldehyde and washed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), and then post-fixed within 1 h in a 1% mixture (1:1) of osmium tetroxide and Phosphate Buffered Saline (PBS). The samples Ndione et al., 2013Topcls. J. Herb. Med. 2(3) p.44

were dehydrated with ethanol and propylene oxide before being embedded in epoxy resin. The sections were cut with ultramicrotome Reichert Porter Blum MT1 and then stained with uranyl acetate and lead citrate. The observations were carried out with an electron microscope named Siemens Elmiskop 101 and Jeol 100 CX II.

Light microscopy

Other samples (moribund, dead and control) larvae were fixed in Carnoy 2's fluid and dehydrated in ethanol. The samples were impregnated in a mixture of butanol/paraffin then embedded in pure paraffin. Sections (5-7 μ m) were done with the microtome "Minot" model "Stiasnie" and stained according to the technique of Trichome of Masson described by Martoja and Martojapierson (1967). At the end of the coloration, the small sections were glued with a balm of Canada on the blades. The blades were dried in a steam-room (60°C). The observations were done with a photonic microscope "Motic Digital Microscope DM-39 Pal System" connected to a computer. The pictures of the midgut cells of mosquito larvae treated and control larvae at different magnifications were taken. Histopathological effects were studied in anterior, middle and posterior parts of the gut.

RESULTS

The mortality of mosquito's larvae

Figure 1 shows the lethal effects of the 1% Suneem (*Azadirachta indica*, A. Juss) on *Anopheles gambiae* s.l. The 1% Suneem, a natural product of neem, is toxic to the *Anopheles gambiae* s.l. larvae at 10 mg/l concentration. The mortality of *Anopheles gambiae* s.l. larvae increases gradually with the decreasing of the 1% Suneem concentration (Figure 1). In the same vein, the percentage of live *Anopheles gambiae* s.l. larvae gradually decreases with the decreasing of the 1% Suneem concentration (Figure 2). The lethal concentration 50 (LC50) of the 1% Suneem is 10 mg/l. The lethal concentration 90 (LC 90) is not observed. The mortality of control larvae is 5%. The mortality of *Anopheles gambiae* s.l. in different concentrations of Suneem is significantly higher compared with the untreated control ($P = 0.0094 < 0.05$). Mortality of *Anopheles gambiae* s.l. are not significantly different in different concentrations ($P = 0.006117 > 0.05$). The results presented in Figure 3 shows the mortality of the 3 and/or 4 instars larvae of *Culex quinquefasciatus*. At 4 mg/l (CL50) of 1% Suneem, *Culex quinquefasciatus* died at 50% within 96 h. The lethal concentration 90 (CL90) is 8 mg/l after exposure of *Culex quinquefasciatus* larvae to 1% Suneem. It was observed that larval mortality increases significantly depending on the time of exposure ($P = 0.0156 < 0.05$) and also on the concentrations ($P = 0.0008 < 0.01$). Correlatively, the percentages of alive *Culex quinquefasciatus* larvae decrease with the increasing of 1% Suneem 1% concentrations (Figure 4). The mortality of *Culex quinquefasciatus* recorded are significantly higher compared with those recorded in the control ($P = 0.0001 < 0.01$). The maximum of mortality in the control samples is recorded at 6% after the exposure of *Culex quinquefasciatus* larvae to 1% Suneem within 160 h.

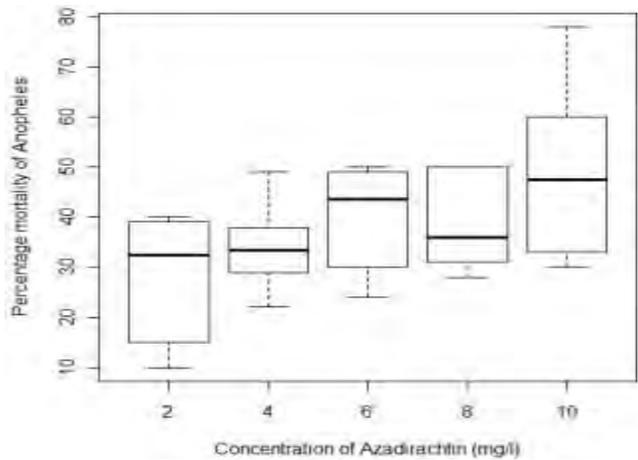


Figure 1. Percentage mortality of the three instars of *Anopheles gambiae s.l* after treatment with Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss)
 Ndione et al., 2013Topcls. J. Herb. Med. 2(3) p.44

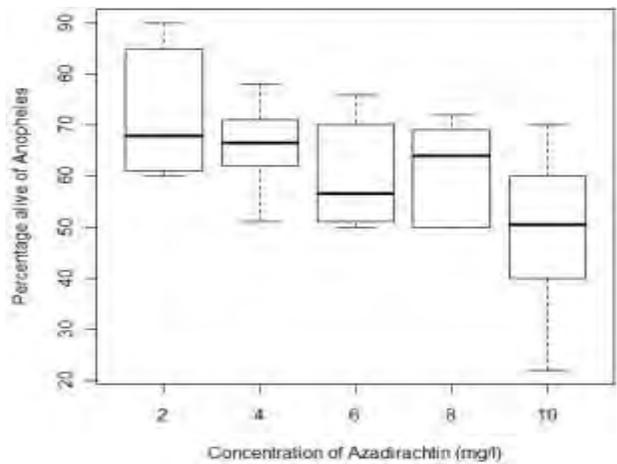


Figure 2. Percentage alive of the three instars of *Anopheles gambiae s.l* after treatment with different concentrations of Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss)

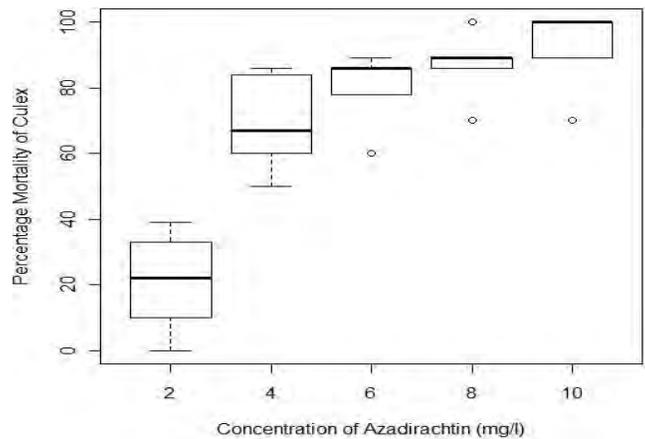


Figure 3. Percentage mortality of the three instars larvae of *Culex quinquefasciatus* after treatment with different concentrations of Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss)

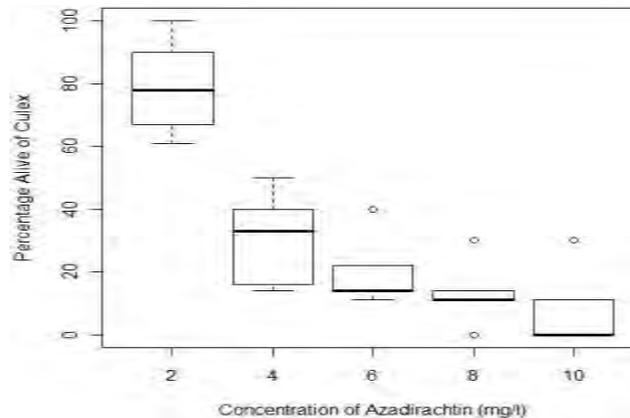


Figure 4. Percentage alive of the three instars larvae of *Culex quinquefasciatus* after treatment with different concentrations of Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss) Ndione et al., 2013Topcls. J. Herb. Med. 2(3) p.48

HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF SUNEEM

Histology of control samples

Photonic Microscopy

The mosquito larvae (control samples) show an anterior gut, a midgut and a posterior gut well preserved. Epithelial cell layer is well in place. The cells rest on a basal membrane and are presented at an apical region, a well developed brush border. Nuclei are rounded in shape. The brush border of the epithelial cells is well defined. Adipose tissue, muscles are normal (Figures 5 and 6).

Electronic Microscopy

In ultra structure, nuclei of epithelial cell layer have dense heterochromatin, a clear euchromatin and a nucleolus. The cytoplasm contain various organelles such as mitochondria, a network of smooth endoplasmic reticulum and granular, many dictyosomes and a golgi apparatus. The epithelial cells are based on a basal membrane consisting of several layers. The brush border (microvilli) is normal in the apical part of epithelial cells (Figures 11 and 12).

Histopathology of experimental samples: effects of 1%

Suneem on mosquito midgut

Histopathological effects on photonic microscopy

There is a slight hypertrophy of epithelial cells in apical regions of experimental samples (Figure 7). Some cells do not have a nucleus. They have a very low volume of cytoplasm (Figure 9). Cytoplasm co-exists with hypertrophied cells (Figure 8). The very broad intercellular spaces are noted between the various cells (Figure 8). The inter-cellular space gives to the epithelium a non-uniform appearance (Figure 7). In some cases, cellular degeneration is accompanied by the disruption of the midgut of experimental samples. Other cytological abnormalities of the midgut included cellular swelling accompanied by cellular necrosis (Figure 10). The location of all detached cells is between epithelium and peritrophic membrane.

Histopathological effects on electronic microscopy

Larvae treated with Suneem 1% shows a gradual disappearance of cellular organelles in ultra structure. The cytoplasm is less homogeneous. There is a significant vacuolation (Figure 13) and the cytoplasm lost nearly a majority of cellular organelles (Figure 14).

DISCUSSION

The extracts of neem seeds kernels, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) contain more than 100 compounds (Addea-Mensah 1998). Among these, azadirachtin (C₃₅H₁₄O₁₆) is the most important bio-insecticide (Mordue and Blackwell 1993; Schmutterer 1990; Zongo et al, 1993). In this study, Suneem 1% induce a mortality of instars larvae of *Culex quinquefasciatus* to 50% at 2 mg/l (CL₅₀) after a period of 24 h. Suneem 1% induces the same mortality (50%) of instars larvae of *Anopheles gambiae s.l.* at 2 mg/l (CL₅₀) after a period of 120 h. Dharmagadda et al (2005), using various concentrations of essential oils on mosquitoes larvae of *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*, found the concentrations lethal 50 (LC 50) respectively 13.57 mg/l, 12.08 mg/l and 22.33 mg/l. The Suneem 1% is more toxic than the essential oils used by Dharmagadda et al (2005). The difference between the Dharmagadda et al (2005) reports and the present one could be due to the difference in plant extract and mosquitoes species. Okumu et al (2007) studying on the larvicidal effects of a neem oil formulation (*Azadirachta indica*) on the malaria vector *Anopheles gambiae s.s.*, found an LC₅₀ value of 11 ppm after 8 days. This lethal concentration 50 (LC₅₀) obtained by Okumu et al (2007) is five times more toxic than LC₅₀ found with Suneem 1% on *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae s.l.* The percentage of mortality (50%) of larvae of *Culex sp*

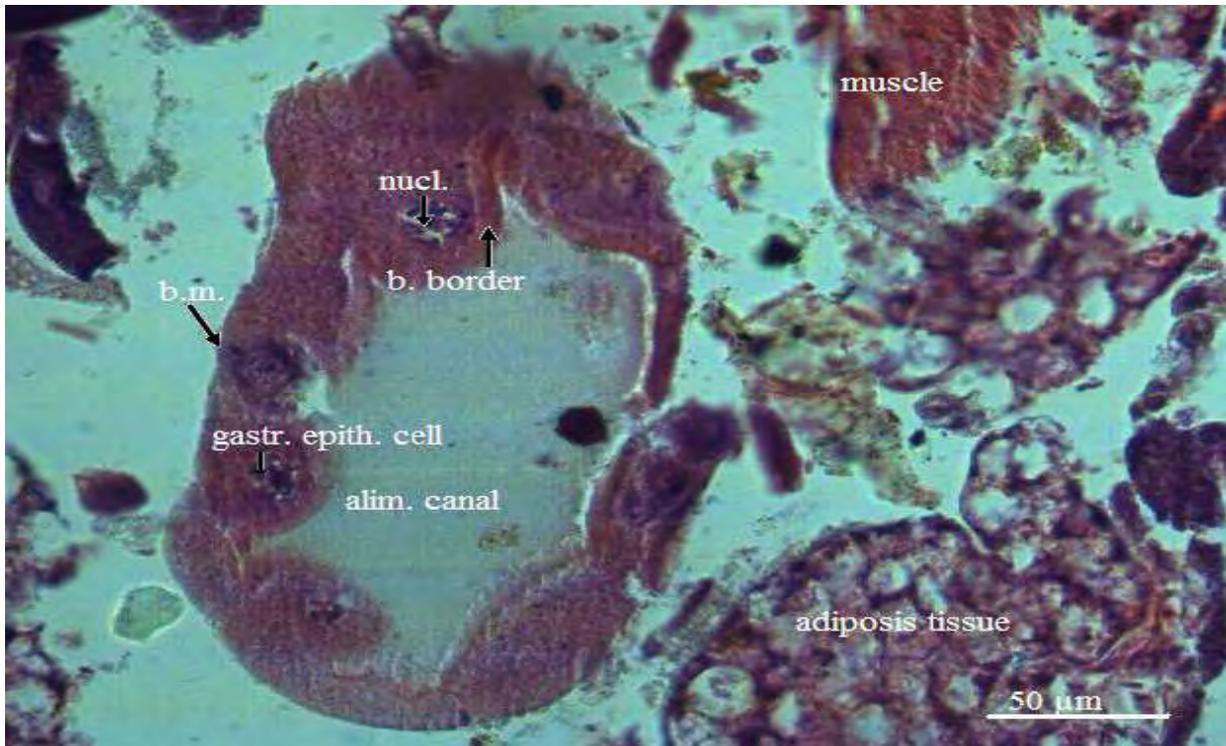


Figure 5. Longitudinal section of a gastric caecum of a control of the 3 instars larvae of *Culex quinquefasciatus*. **b.m.:** basal membrane, **nucl.:** nucleus, **gastr. epith. cell:** gastric epithelial cell, **alim. Canal:** alimentary canal, **b. border:** brood border. The scale bar (line) is 50 microns.

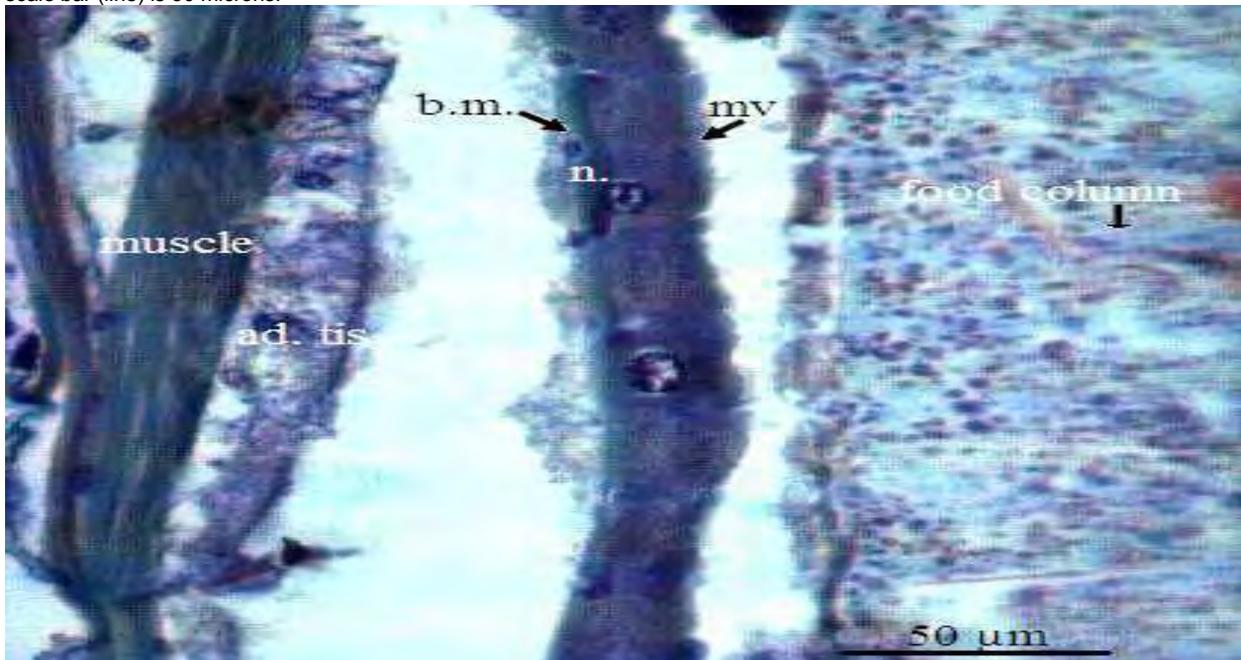


Figure 6. Longitudinal section of the midgut of the 3 instars control larvae of *Culex quinquefasciatus*. **b.m.:** basal membrane, **n.:** nucleus, **mv:** microvilli ; **ad. tis.:** adipose tissue. The scale bar (line) is 50 microns. Ndione et al., 2013Topcls. J. Herb. Med. 2(3) p.48

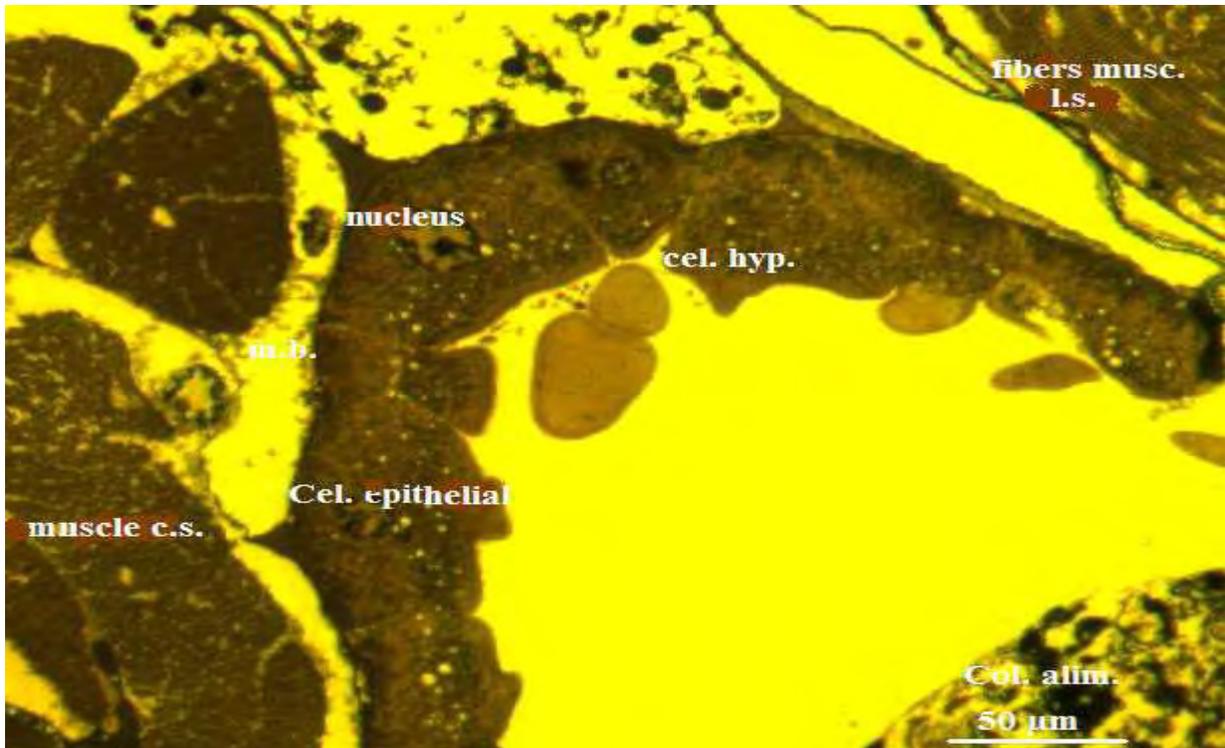


Figure 7. Longitudinal section of the midgut of 3 instar larvae of *Anopheles gambiae s.l.* treated with Suneem 1%. **Muscle c.s.:** muscle in cross section, **fibers musc. l.s.:** fibers muscles in longitudinal sections, **m.b.:** basal membran. **Cel. Hyp:** Cell hypertrophied. The scale bar (line) is 50 microns.

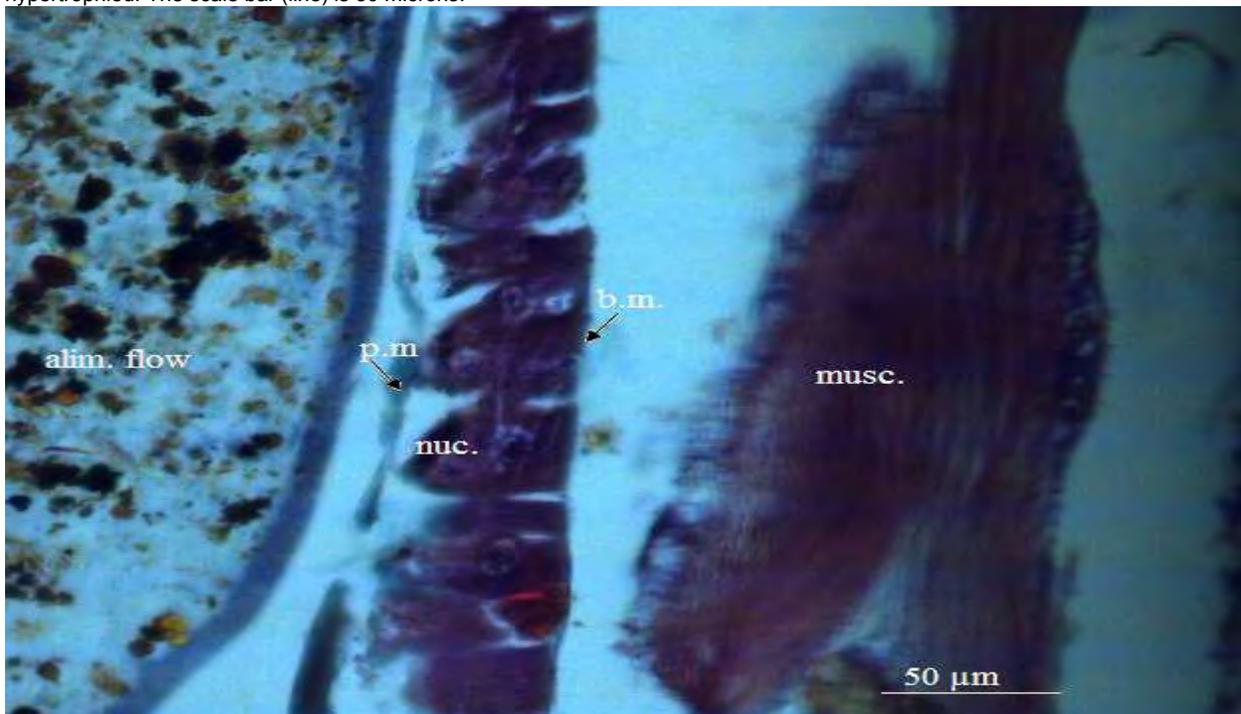


Figure 8. Longitudinal section of the midgut of 3 instar larvae of *Culex quinquefasciatus* treated with Suneem 1%. **b.m.:** basal membran, **m.p.:** peritrophic membran The scale bar (line) is 50 microns.

Ndione et al., 2013Topcls. J. Herb. Med. 2(3) p.48

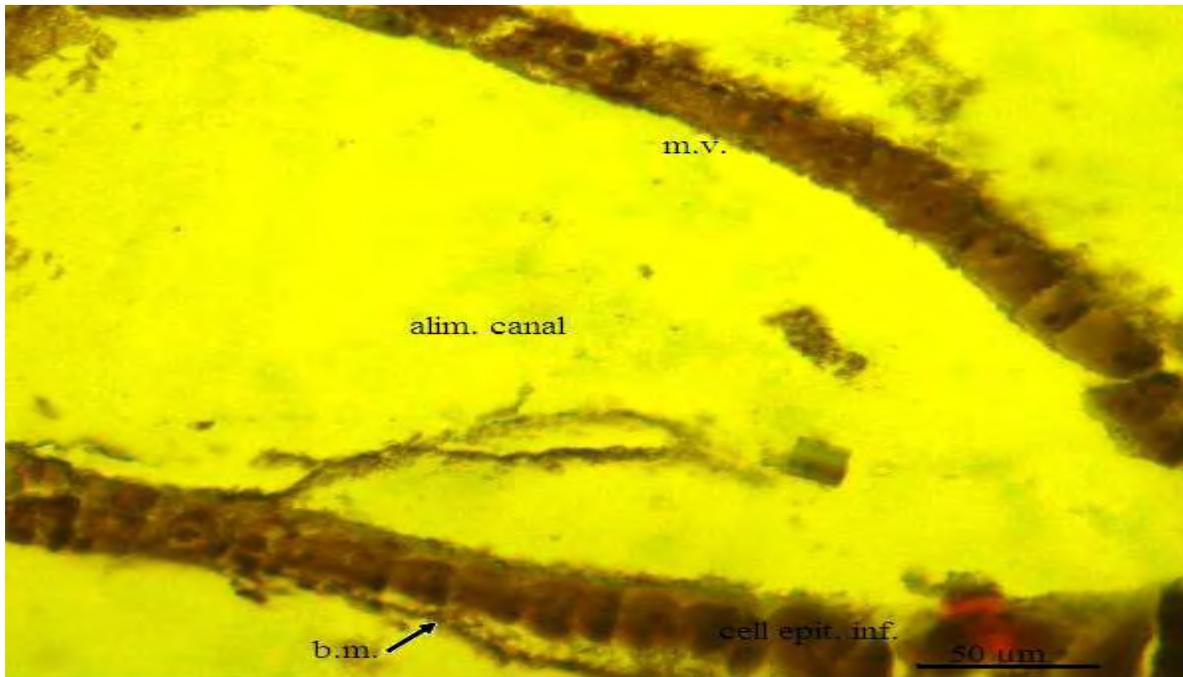


Figure 9: Longitudinal section in the hindgut of a 3 instar larvae of *C. quinquefasciatus* treated with Suneem 1%. **mv:** microvilli, **alim. canal:** alimentary canal, **b.m:** basal membran, **cel. epith. inf.:** epithelial cells infected. The scale bar (line) is 50 microns

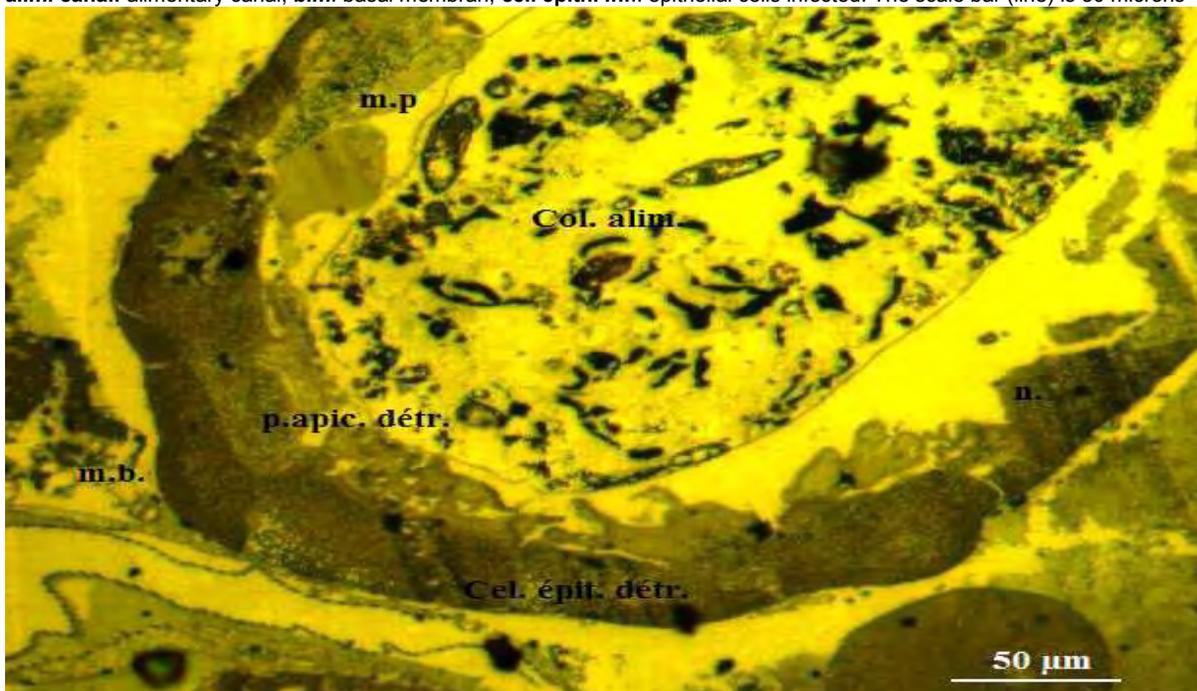


Figure 10. Longitudinal section passing in the hindgut of a 3 instars larvae of *Culex quinquefasciatus* treated with Suneem 1%. **m.p:** peritrophic membran, **col. alim:** column alimentary, **p. apic. détr:** apical pole destroyed, **cel. epit. détr:** cell epithelial destroyed, **n:** nucleus, **m.b:** basal membran. The scale bar (line) is 50 microns.

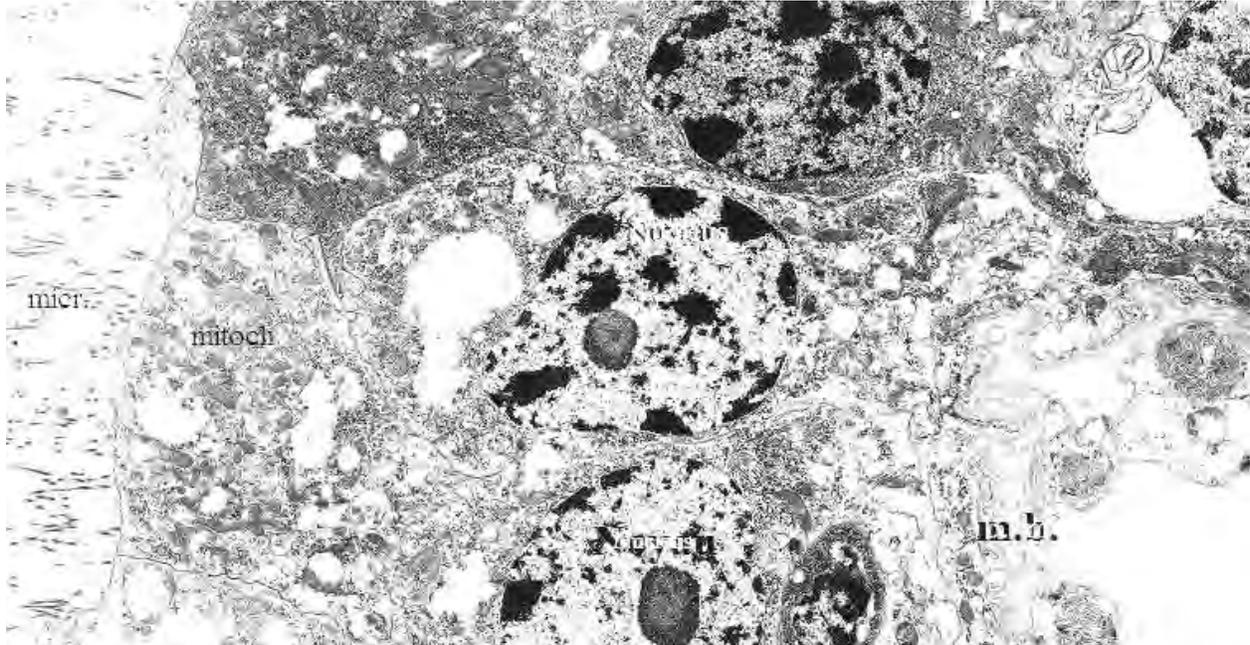


Figure 11. Ultrastructure of the midgut epithelial cells for control of mosquitoes larvae with well developed brush border or microvilli (micr). Nucleus are connected with a densely endoplasmic reticulum (end. reticul). There is a distribution of mitochondria (mit.) mostly in the apical region of the cell. Magnification : x 43.207

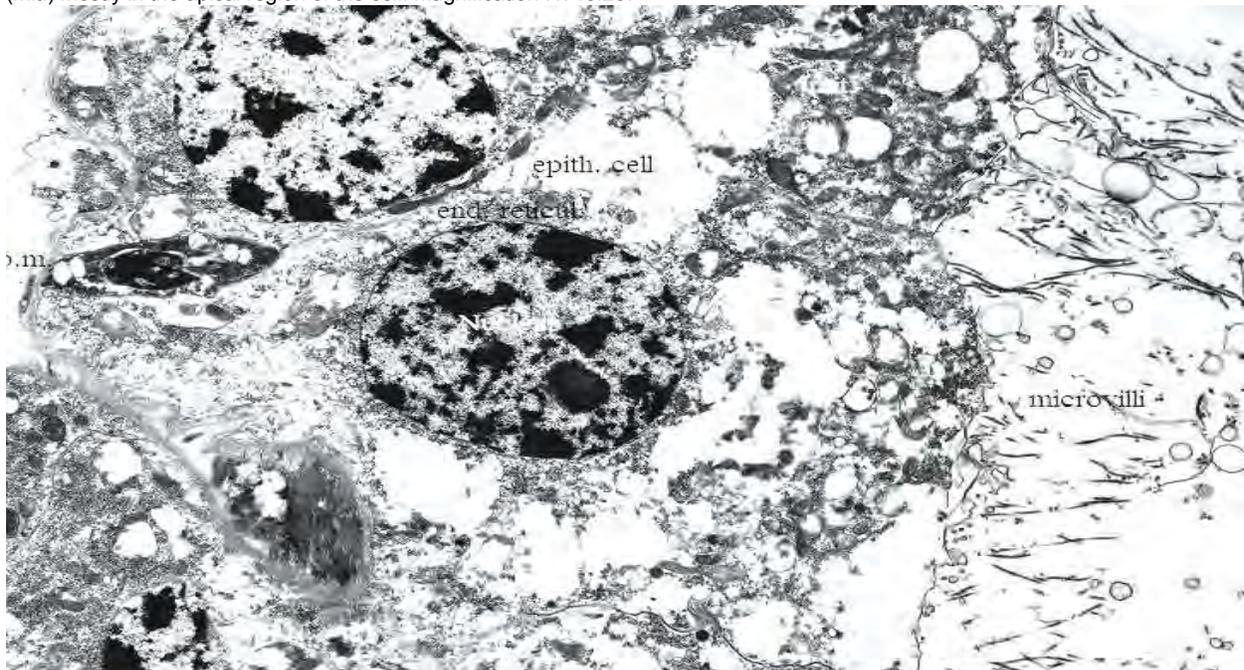


Figure 12. Ultrastructure of the midgut epithelial cells for control of mosquitoes larvae with well developed brush border or microvilli (micr). Nucleus are connected with a densely endoplasmic reticulum (end. reticul). There is a distribution of mitochondria mostly in the apical region of the cell. Magnification : x 43.203

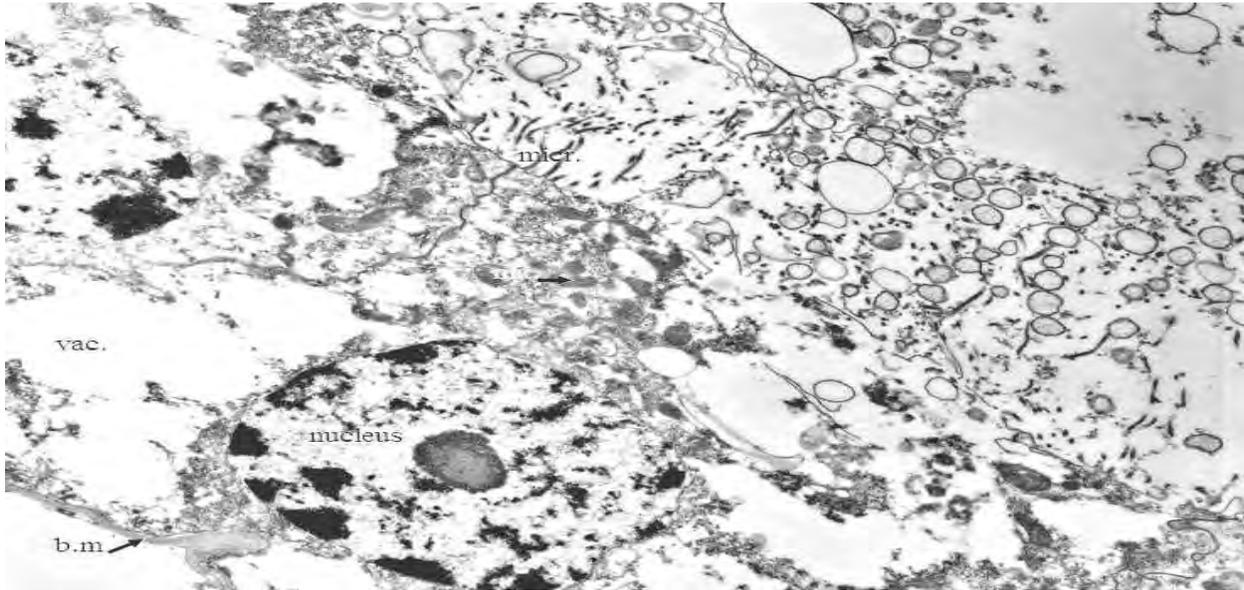


Figure 13. Ultrastructure of the midgut epithelial cells of mosquitoes larvae treated with Suneem (*Azadirachta indica*, A. Juss). The cytoplasm is not dense. Magnification : x 43.202.

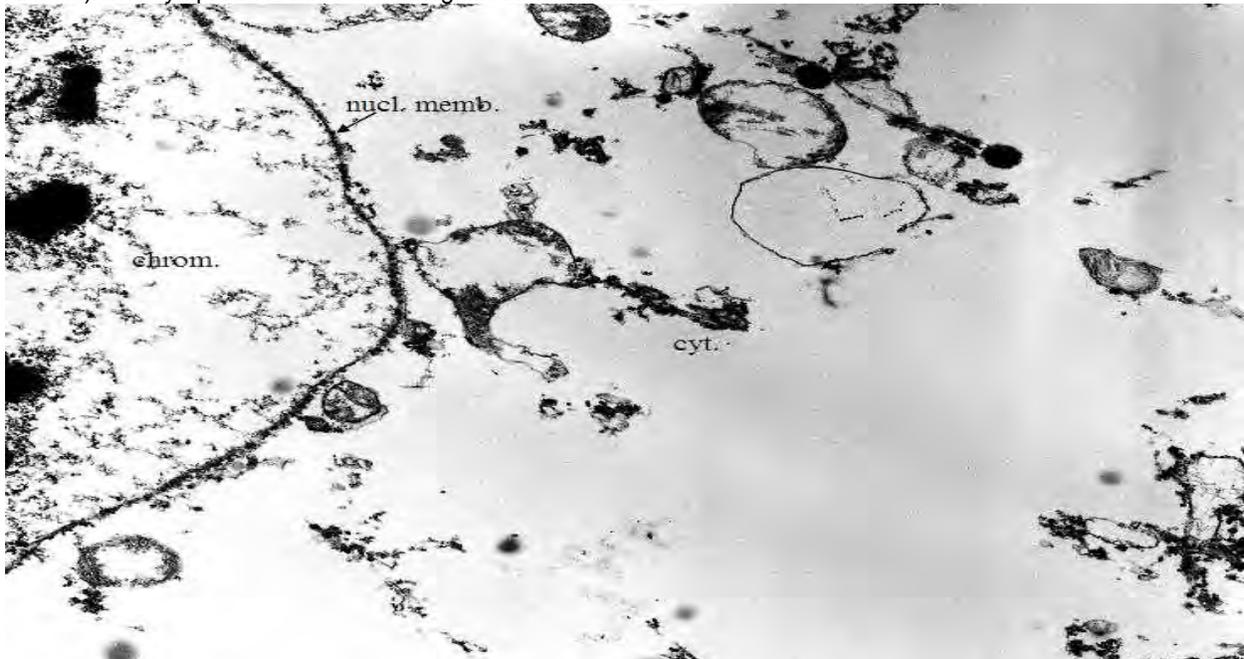


Figure 14. Ultrastructure of the midgut epithelial cells of mosquitoes larvae treated with Suneem (*Azadirachta indica*, A. Juss). The cytoplasm is not dense. Organelles are almost absent. Magnification : x 43.203.

exposed to either 8-16 mg/l of Margosan-O in laboratory chronic bioassays (Scott and Khaushik 1998) was significantly higher ($P < 0, 05$) than the mortality determined for *Culex quinquefasciatus* larvae exposed to 2 mg/l Suneem 1%. The CL_{50} (2 mg/l) obtained in this study is similar to those (3, 7 mg/l) obtained by Ouedraogo et al. (2005) when they expose the instars larvae of *Culex quinquefasciatus* by *Bacillus sphaericus* after 48 h. However the CL_{50} of Suneem 1% is significantly higher than the CL_{50} (0,10 mg/l) obtained by Hougard et al (1983). Suneem 1% has a larval mortality of 90% at 6 mg/l after 120 h of exposure. Singh (2003) found that a concentration of 32.1 ppm of a deoiled neem seed kernel extract yielded 90% mortality in *Culex quinquefasciatus* after 12 days of exposure. Comparing the results of Singh (2003) to those of this study, it can be said that CL_{90} for Suneem 1% is significantly ($P < 0, 05$) higher than CL_{90} of Suneem 1%. This activity of Suneem 1% could be due to azadirachtin and a solvent (tetra hydroxyfurfuryl alcohol). Wandscheer et al (2004) found, after testing the *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Aedes aegypti* the mosquito vector of dengue fever, a LC_{50} values for the crude extracts of these two members of the Meliaceae ranged from 0.017 to 0.034 % while the LC_{90} values ranged from 0.133 to 0.189 %. The mortality of mosquito's larvae increases with the time of exposure. This is confirmed by a relatively low lethal concentration 50 (LC_{50}) found for *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae s.l.* Histopathological effects of bioinsecticides on various kinds of insects have been reported by many researchers (Karch and Coz, 1983; Syafruddin et al, 1990; Nasiruddin and Mordue, 1993; Koua et al, 1998; Ruiz et al, 2004; Cavados et al, 2004, Mehmadi and Al-Khalaf 2010). The effects of azadirachtin on mosquitoes larvae in both light and electron microscopic levels is revealed by the studies of this authors (Ndione et al, 2006; Seye et al, 2006; Ndione et al, 2007, Mehmadi and Al-Khalaf 2010). The effects of Suneem 1% on third instars larvae of *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae s.l.* of the control and treated larvae is demonstrated in this study. In the control group, within 24 to 48 h, in photonic microscopy level, an epithelial cell layer was noted with a brush border well developed, an adipose and muscle normal tissues. The epithelial cells contain various organelles such as mitochondria, dictyosomes, golgi apparatus, a network endoplasmic reticulum and granular. In the treated group, a gradual disappearance of cellular organelles and significant vacuolation was observed. Cytoplasm is less homogeneous. Ruiz et al, 2004 found a significant vacuolization, swollen nuclei and elongated epithelial cells of the mosquito larvae. These epithelial cells were disrupted at the apical region with vesicle formation, lysis and leakage of cytoplasm material into the gut lumen. These results with Suneem 1% are also similar to those described by Ruiz et al, 2004. The only difference however was the bioinsecticides. (Suneem 1% and *Bacillus thuringiensis*) are not the same. *B. thuringiensis* is a bacteria compared to Suneem which is a plant extract. The same result can be compared with the results of Cavados et al, 2004. These authors working on the effect of endotoxins of *B. thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* found swollen cells, an important vacuolation, a secretion vesicles and an irregular brush border. The results of Cavados et al., 2004 are similar to results observed with Suneem 1%. However results of the report of Al- Mehmadi and Al-Khalaf, 2010 shows a midgut columnar cell vacuolization, microvilli damages, epithelium cell contents passing into the midgut lumen and finally the cell death. The damages of midgut epithelium described in Al-Mehmadi and Al-Khalaf, 2010 report are approximately similar to those in this current study. The damage descriptions are similar to those described by Karch and Coz, 1983. In fact, Karch and Coz, 1983 showed a disturbance of alimentary flow, a hypertrophy or swelling of the cells, an invaded vacuoles followed by a rejection of the cytoplasm material.

CONCLUSION

Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A Juss) has larvicidal and cytopathological activity against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae s.l.* Suneem act as an effectiveness activity on *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae s.l.* mosquito and could be specially used to control the mosquito's larvae. Suneem 1% is a good alternative for pest control.

AKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Department of Animal Biology of the Faculty of Sciences and Techniques of the Cheikh Anta Diop University of Dakar (Senegal). We also thank Dr. Abdoulaye Dieye from Senchim industry for the donation of the Suneem 1%, M.D Ngom, D. Diouf and M. Mbengue for their technical help.

REFERENCES

Addea-Mensah I (1998). The uses of the *Azadirachta indica* (neem) in Ghana and their relations of the chemical constituents and biological activities. Proc. Seminar held Dodowa: 11-26.

Al-Mehmadi RM, Al-Khalaf AA (2010). Larvicidal and histological effects of Melia azedarach extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). J. King Saud University (Science), 22:77-85.

Azmi MA, Naqvi SNH, Ahmad I, Tabassum R and Anbreen B (1998). Toxicity of Neem Leaves Extract (NLX) compared with Malathion (57 E.C.) against late 3rd instar larvae of *Culex fatigans* (Wild Strain) by WHO Method. Tr. J. Zool. 22:231-218.

Batra CP, Mittal PK, Adak T, Sharma VP (1998). Efficacy of neem oilwater emulsion against mosquito immatures. Indian J. Malariol. 35(1):15-21

Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araujo-Coutinho CJPC and Rabinovitch (2004). Histopathological and Ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99(5):493-498.

Dharmagadda VSS, Naik SN, Mittal PK, Vasudevan P (2005). Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. Bioresource Technol. 96:1235-1240.

Hougard JM, Darriet F and Bakayoko S (1983). Valuation of natural larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 and *Anopheles gambiae* Giles, 1902 sl (Diptera: Culicidae) in West Africa. Cah. ORSTOM., Ser. Ent. med. and Parasitol.21(2):111-117.

Karch S and Coz J (1983). Histopathology of *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae) subjected to larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593-4. Cah. ORSTOM., Ser. Ent. med. and Parasitol. 21(4):225-230.

Koua HK, Han SH, d'Almeida MA (1998). Histopathology of *Anopheles gambiae* sl Giles, 1902 (Diptera, Culicidae) subjected to larvicidal activity of watery extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae). Bull. Soc. Pathol. Exot. 91(3): 252-256.

Lucantoni L, Giusti F, Cristofaro M, Pasqualini L, Esposito F, Lupetti P, Habluetzel A (2006). Effects of neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Tissue and Cell 38:361-371.

Martoja R, Martoja-Pierson M (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie. Paris, p. 345.

Mishra AK, Singh N, Sharma VP (1995). Use of neem oil as mosquito repellent in tribal village of mandla district, Madhya Pradesh. Indian J. Malariol. 32(3):99-103.

Mordue AJ, Blackwell A (1993). Azadirachtin: an update. J. Insect Physiol. 39:903-924.

Nasiruddin M, Mordue (Luntz) AJ (1993). The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locust, *Scistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. Tissue and Cell 25(6):875-884.

- Ndione RD, Faye O, Ndiaye M, Dieye A, Afoutou JM (2007). Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica*, A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. Afr. J. Biotechnol. 6(24):2846-2854.
- Ndione RD, Sèye F, Ndiaye M, Sow AI (2006). Histopathological effects of neem products on the larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae). Dakar Med. 51(2):107-112.
- Okumu FO, Knols BG, Fillinger U (2007). Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Malar. J. 6:63 Abstract.
- Ouedraogo TDA, Baldet T, Skovmand O, G Kabre, Guiguemde TR (2005). Sensitivity to insecticides of *Culex quinquefasciatus* in Bobo Dioulasso (Burkina Faso). Bull. Soc. Pathol. Exot. 98 (5) :406-410
- Ravindran J, Eapen A, Kar I (2002). Evaluation of repellent action of neem oil against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus*(Diptera: Culicidae). Indian J. Malariol. 39 (1-2):13-17.
- Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S (2004). In vivo binding of the Cry 11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. Medellin to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae), Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99 (1): 73-79.
- Schmutterer H (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35:271-297.
- Scott IM, Kaushik NK (1998). The toxicity of Margosan-O, a product of neem seeds, to selected target and non-target aquatic invertebrates. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35:426-431.
- Scott IM, Kaushik NK (2000). The toxicity of a neem insecticide to populations of *Culicidae* and other aquatic invertebrates as assessed in *In Situ* Microcosms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39:329-336.
- Seye F, M Ndiaye, Ndione RD (2006). Comparative study of two neem products (oil and powder) on the pre-imaginal stages of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Africa Science (2):212- 225.
- Singh S (2003). Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae). J. App. Entomol. 9(10):540
- Su T and Mulla MS (1998). Ovicidal activity of neem products (Azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Am. Mosq. Control Assoc. 14(2):204-209.
- Su T, Mulla MS (1999). Oviposition bioassay responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* to neem products containing azadirachtin. Entomologia Experimentalis et Applicata, 91:337– 345. doi: 10.1046/j.1570-7458.1999.00500.x
- Syafuddin, Arakama R, Kamimura K and Kawamoto F (1990). Histopathological effects of insect growth regulator, 4- phenoxyphenyl (RS)-2(2-pyridyloxy) propyl ether (pyriproxyfen), on the larvae of *Aedes aegypti*. Jpn. J. Sanit. Zool. 41(1):15-22.
- Zongo JO, Vincent C, Stewart RK (1993). Effects of neem seed kernel extracts on egg and larval survival of the sorghum shoot fly, *Atherigona soccata* Rondani (Dipt.: Muscidae). J. Appl. Entomol. 115:363-369.
- Wandscheer CB, Duque JE, Dasilva MAN, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J, Fontana JD (2004). Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. Toxicon. 44:829–835

ANNEXE 2

Topclass Journal of Herbal Medicine Vol. 4(1) pp. 9-15, 26 Jan., 2015

Available online at <http://www.topclassglobaljournals.org>

ISSN 2315-8840 ©2015 Topclass Global Journals

Submitted 29/3/14 Accepted 17/12/14

Full Length Research Article

Knockdown (kdr) mutation in the resistance of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes to Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. Juss)

Raymond Demba Ndione¹, Mady Ndiaye¹, Ioan Moglan², Lucian Gorgan²

¹University Cheikh Anta Diop de Dakar, Faculty of Sciences and Techniques, Department of Animal Biology, Laboratory of the Biology of the reproduction, Unity of Entomology, Rickettsiology, Bacteriology and Virology BP 5005 Dakar-Fann (Senegal)

²Alexandru Ioan Cuza University of Iasi, Faculty of Biology, Laboratory Molecular Genetics, Carol I Bd. No 20 A 700505

Abstract

The larval susceptibility levels to Suneem 1% of *Culex quinquefasciatus* strains have determined. The 12 mg/l, 9 mg/l, 18 mg/l and 14 mg/l concentration caused 50% and 90% mortality of young instars (states 1 and 2) larvae of *Culex quinquefasciatus* after respectively 24 hours and 48 hours. For late instars larvae, the C > 20 mg/l caused 50% and 90% mortality. Also, indeed Suneem are very effective, Some *Culex quinquefasciatus* larvae show resistance. In fact, After amplification of DNA isolated, we observe a band between 1200 and 1400 bp for the natural population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG0) and for generation 1 (DSenCqG1). But for the generation 5 (DSenCqG5), electrophoresis has show an amplification of kdr gene between 100 and 200 bp. Comparing the sequences of natural population (DSenCqG0) and treated population of *Culex quinquefasciatus*, we note differences in the bases at the positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17 lands. These differences are also observed at positions 569, 571, 572, 573, 574, 575, 577, 578, 579, 582 and at the positions 603, 604, 605. To control the mosquitoes of *Culex quinquefasciatus* and others genus, Suneem 1% is effective but resistance can be a major obstacle.

1. Introduction

Diseases (malaria, yellow fever, dengue and filariasis) began to be very numerous in the cities but also in rural african countries such as Senegal. The amplification of the diseases is due to the proliferation of mosquito's larva in natural breeding sites. In Senegal, to fight against mosquitoes health programs use chemical insecticides on larvae, pupae and adult. Many treatments with

chemical insecticides have given strains that have ability to tolerate toxic doses. The strains are mutants and they have physiological and enzymatic equipment permitting them to survive to the lethal doses of chemical insecticides. Mosquito's resistance has noted. Resistant species complex *A. gambiae* (*A. saccharovi*, *A. stephensi* and *A. Culicifacies sundarcus*) was noted with the use of DDT and Dieldrin (Hamon & Garrett-Jones, 1963). *Culex tarsalis* has developed resistance to malathion in California. In 1960, a similar resistance to malathion was observed in *Culex pipiens fatigans* Wiedeman in Cameroon (Mouchet *et al.*, 1960). *Aedes nigromaculis* (Ludlow) has developed resistance to organophosphates in California region (Lewallen & Gilles, 1963). Also, induced resistance of *Aedes aegypti* to Malathion was made in the laboratory by researchers (Abeni & Brown, 1960). Resistance began to develop in repetitive treatments of mosquito larvae by insecticidal products of biological origin such as neem (*Azadirachta indica* A. Juss). This observation was made after several treatments in laboratory conditions mosquito larvae by neem products. Mosquito larvae DSenCqG0 strains have survived to different concentrations of neem. These observations were made during the studies of Seye *et al.* (2006), Ndione *et al.* (2005), Ndione *et al.* (2007). It is the fact that we involved the determination of the resistance genes of mosquitoes to neem products.

2. Materials and Methods

2.1. Materiel

2.1.1. *Culex quinquefasciatus* strains

Three kinds of strains of mosquito *Culex quinquefasciatus* were used in this study:

- DSenCqG0 (Dakar, Senegal, *Culex quinquefasciatus*, generation zero) are collected in university of Dakar. These mosquitoes were reared in laboratory conditions $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ under a relative humidity of $82\% \pm 10\%$ and a photoperiod of 12:12 (L:D) hours.
- DSenCqG5 strains (Dakar, Senegal, *Culex quinquefasciatus*, generation five) that have been selected with 1% Suneem for five (5) generations after collection.
- DSenCqG1 strains (Dakar, Senegal *Culex quinquefasciatus*, generation one) that have treated and deaded after treatment with 1% Suneem.

2.1.2. The bioinsecticidal product: Suneem 1 % EC

The bioinsecticidal product used in this study is the Suneem 1%. It is a product formulated from the azadirachtine and a solvent (Tetrahydrofurfuryl alcohol (THFA)). It is made by a senegalese industry (Senchim¹) of located insecticidal formulation of products in Km 13 of Rufisque of Dakar (Senegal).

3. Method

3.1. Larval tests

3.1.1. Suneem 1% selections

DSenCqG0 strains mosquitoes were selected with Suneem 1% for five generations (DSenCqG5 strains) in laboratory conditions (temperature $\sim 27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ and a relative humidity $\sim 82^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$) after collection in natural breeding sites in Dakar (Senegal) and in artificial sites in the department of animal biology of cheikh Anta Diop University of dakar. The concentration for each selection was sufficient to kill 50% of treated individuals (CL 50) and 90% (CL 90) in

generation 1 and 2 instars larvae after 24 hours (table 1). DSenCqG1 strains were obtained were selected with Suneem 1% after one generation.

3.1.2. DNA isolation

All *Culex quinquefasciatus* mosquitos' strains were dried at 75°C before DNA extracation. Genomic DNA from 1% Suneem survivors (DSenCqG5), 1% Suneem dead (DSenCqG0) and natural population (DSenCqG1) were extracted using phenol-chloroform method as described. Samples were placed in an Eppendorf tube containing 300µl type 1.5 ml of buffer (50 Mm Tris-HCl, pH = 8, 1% SDS, 25 Mm EDTA) and 20 µl of protein kinase 20 mg / l. The tube is placed in a water bath at 65 ° C for 60 min to inhibit the activity of enzymes that can destroy DNA. Then we then added an equal volume of phenol: chloroform: isoamyl (25: 24: 1) in the tube and was shaken gently to mix the phases. We then centrifuged the mixture at 12,000 rpm for 5 min to separate the phases. We removed the aqueous phase to a new tube and added an equal volume of chloroform to remove all traces of phenol. To precipitated DNA we use the following procedure: we added 1/10 volume of 3M sodium acetate pH = 5.2 and 2 volumes of 100% ethanol stored at - 20 ° C. Then we mixed and kept the tube at - 20 ° C for one hour or until the DNA strands in solution appear. The solution is then centrifuged at 14,000rpm in a standard microcentrifugeuse for 10 minutes. We decanted the supernatant and wash the DNA pellet with 1 ml of 70% ethanol at room temperature. The pellet was then dried. Finally, the DNA was resuspended with 100 l of Tris-EDTA and kept refrigerated at 4°C for at least overnight before use.

3.1.3. Amplifications of Sodium Channel gene of *Culex quinquefasciatus*

The PCR were performed to detect *kdr* mutation following the protocol Martine-Torres *et al.* (1999) with minor modifications in the concentrations of the reagents. The sodium channel gene contains *kdr* mutation. Two rounds of PCR reactions were conducted. The first PCR solution with 1µl of cDNA template and a pair primer KDR S1 (Forward) 5'CTTACTCATTTCATCATGG3'and KDR AS1 (Reverse) 5'GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG 3'. The mixture reaction contained 1X PCR buffer, 10 mM of dNTP, 50 mM of MgCl₂ and 2.5 U of taq polymerase with a final reaction volume of 3,5 µl. The reaction was heated to 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of PCR (94°C for 30s, 55°C for 30s and 72°C for 1min) and a final extension of 72°C for 10 min. The second round of PCR, containing 1µl of the first PCR solution, a pair primer KDR ALS1 (Forward) 5'GCGTTAGGTAATCTGACGTTTGTGC3' and KDR AS1 (Reverse) 5'GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG3'was conducted under the same reaction conditions described above except that 38 cycles and a 58°C of annealing temperature were used.

3.1.4. Electrophoresis

To have a 2% of gel agarose, we have diluted 2g of agarose in 100 ml of 0.5 X TBE and then we have placed it in a microwave oven for 2 min. We added 5 µl of ethidium bromide (10 mg/ml) to give a concentration of 0.5 mg/ml of the agarose gel. After, we poured the gel into the mold with combs taking care to clear the air bubbles. We waited for the gel polymerizes before transferring it into the tray containing 0.5 X TBE buffer as electrolyte. To see the traces of DNA, we mixed 12µl of the amplified DNA in a drop of dye (the blue of Bromotymol) before to stay it in the

wells of the gel. The migration was carried out under a current of 150 volts for 1 hour using a generator “Electrophoresis Power Supply- EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech.)”. After migration, bands are visualized using a UV box and then photographed by camera Quick Shooter (IBI, Model QSP / HOOD # 14, Catalog. No. 46420). the size of amplified products was estimated by the presence of standards with bands of Known molecular weights (100 bp DNA Ladder, Ready-Load™ Invitrogen, Cat. No. 10380 - 012). The regions that we object to amplify are: 293 bp band: control, 195 bp band: resistant allele and 137 bp band: susceptible allele

3.1.4. Purification of DNA

We first prepared a fresh solution of glycogen by purification with the following mixture: 3M NaAc (μl): 2μl, 100mM Na-EDTA: 2μl, 20mg/ml glycogen (1μl). Then we added in each tube 5 μl of this solution mixed with glycogen. We transferred the sequencing reaction tubes in properly labeled 0.2 ml tube and we well mixed. Then we added 60 μl of a mixture (V/V) ethanol/water cold -20°C and we well mixed. After we centrifuged the tubes at 14,000 rpm at 4°C for 15 minutes. We carefully removed the supernatant with a micropipette. Subsequently, we dried for 10 minutes. Then, we resuspended the samples in 40 cl of samples loading solution provided with the kit.

3.1.5. Sequencing

Sequencing of purified fragments was performed with an automatic sequencer. The storage cycle sequencing kit was made at -20 ° C in a freezer.

3.1.6. Preparation of the reaction of DNA

The sequencing reaction was prepared in 0.2 ml of a thin tube or microplate wells. All reagents were kept on ice while preparing and sequencing reactions were added in the order listed below. dH₂O: 0-9,5μl, the matrice of DNA (0,5-100μl) 47 amorce de séquençage 1,6 μM- 2μl, DTCS Quick Start Master Mix: 8,0 μl

Note: The reaction components are thoroughly mixed. The liquid is bound in the bottom of the tube by a brief centrifugation prior to sequencing.

This reaction mixture was subjected to a cycle sequencing in the sequencer: 96°C for 20 s, 50°C for 20s and 60°C (4 mn) during 30 cycles at 4°C. Computer analysis of the signals collected by the photometer allows for the sequence with high precision.

4. Results

4.1. Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* to Suneem 1%

The table 1 gives the values of CL50 and CL90 of the young (1 and 2) instars larvae of *Culex quinquefasciatus* larvae and adults (3 and 4) after 24 and 48 hours. Resistance Ratio (RR) at 50% of *Culex quinquefasciatus* to Suneem 1% are respectively 1.33 and 1 and those at 90% are 2 and 1.55 for young instars larvae. On the other hand, for respectively young and old instars larvae, the rates of resistance at 50% and 90% are 1.44 and 1.

Table 1: Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* larvae to 1% Suneem.

Strain	time	n	LC ₅₀	LC ₉₀	RR ₅₀	RR ₉₀
<i>Cx quinquefasciatus</i> (1 and 2 instars larvae)	24 hours	100	12 mg/l	18 mg/l	1,33	2
	48 hours	100	9 mg/l	14 mg/l	1	1,55
<i>Cx quinquefasciatus</i> (3 and 4 instars larvae)	24 hours	100	> 20 mg/l	> 20 mg/l	1,44	1
	48 hours	100	14 mg/l	> 20 mg/l	1	1

n: number of mosquitoes treated

RR: were calculated as the ratio of susceptible strains divided by the ratio of non susceptible (or resistant) strain.

We note that the concentration of the DNA samples of *Culex quinquefasciatus* of natural population (DSenCq G0) is 100 ng/μl, for the population of generation 1 (G1 DSenCq) is 65 ng/μl and finally for the generation 5 (G5 DSenCq) is 25 ng/μl (Figure 1).

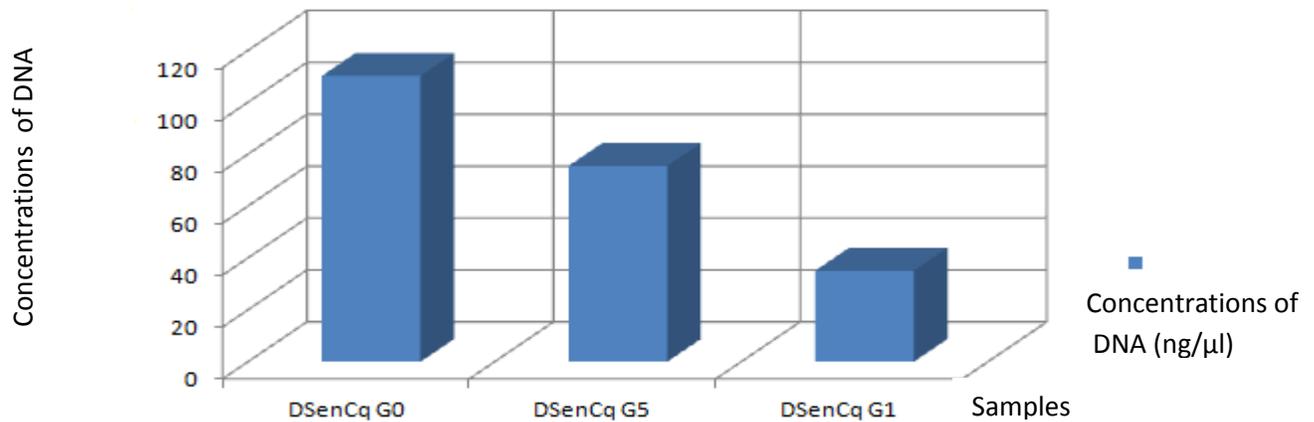


Figure 1: DNA concentrations extracted by phenol-chloroform method of the three samples of *Culex quinquefasciatus*.

This extraction method gave a concentration of the DNA of *Culex quinquefasciatus* generation G0 (DSenCqG0) respectively greater than 40 ng / μ and 80 ng / microl generations G5 (DSenCqG5) and G1 (DSenCqG1).

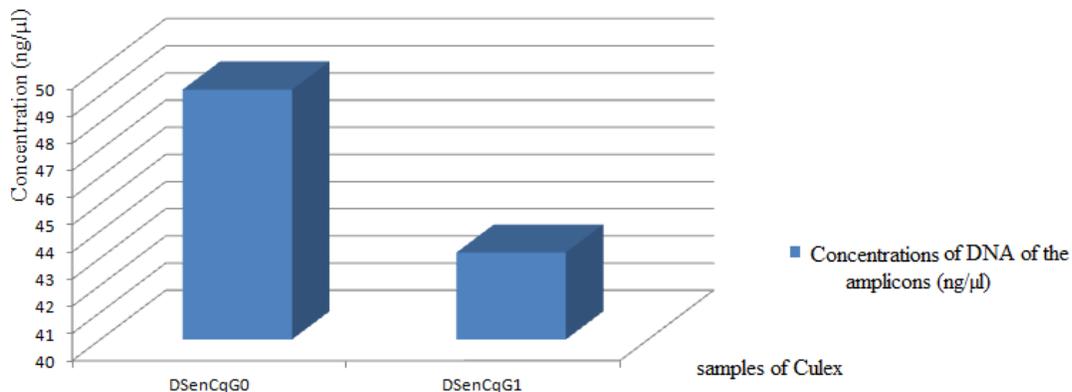


Figure 2: DNA concentrations extracted of the amplicons of the *Culex quinquefasciatus*

The figure 2 shows the concentrations of DNA amplicons of the natural population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG0) and generation 1 (DSenCqG1). The analysis of this Figure 2 shows a concentration of DNA amplicons of the natural population of *Culex quinquefasciatus* equal to 48.5 ng/μl (DSenCqG0) and the concentration of amplicons of the generation 1 (DSenCqG1) equal to 42.5 ng/μl.

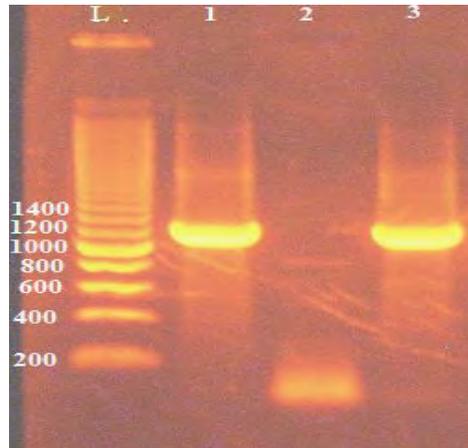


Figure 3: Amplifications of kdr gene of the three samples of *Culex quinquefasciatus* showed by electrophoresis on agarose gel (Promega®). L.= ladder, 1= DSenCqG0, 2= DSenCqG5 and 3 = DSenCqG1.

After amplification and visualization by electrophoresis, we observe a band between 1200 and 1400 bp for the natural population of *Culex quinquefasciatus* (DsenCqG0) and also for generation 1 (DSenCqG1). But for the generation 5 (DSenCqG5), electrophoresis a shows a amplification of kdr gene between 100 and 200 bp.

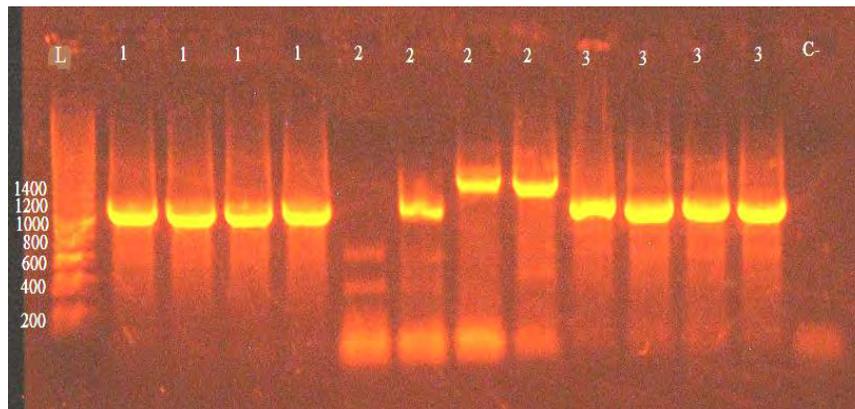


Figure 4: Amplicons of kdr gene of the three samples of *Culex quinquefasciatus* showed by electrophoresis on agarose gel (Promega®). L.= ladder, 1= DSenCqG0, 2= DSenCqG5 and 3 = DSenCqG1.

Lanes L and C- : DNA ladder and negative control

Lane 1: sus/sus is susceptible genotype

Lane 2: kdr/kdr is kdr mutation genotype

Lane 3: sus/sus is susceptible genotype

4.3. Sequences « resistance » and « control » strains (DSenCqG5) of *Culex quinquefasciatus*

Sequence of control population of *Culex quinquefasciatus*

G C G T G T G T T T T T C T T T T C A C T A C A G T G G C C A A G A A A A A T G

Sequence of KDR gene of natural population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG0)

Sequence of KDR gene of treated population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG5)

G A C T G A A T T T C C C T A T A C A C T A C A G T G G C C A A G A A A A A T G
A C G A C T G A A T T T C C T A T C A C T A C A G T G G C C A A G A A A A A T G

40

Sequence of KDR gene of natural population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG0)

Sequence of KDR gene of treated population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG5)

A A A T T T T G G C T G A T T T G G G C G A G A C A T T T T G T A C T T G T T G
A A A T T T T G G C T G A T T T G G G C A G A C A T T T T G T A A C T T G T T G

500

Sequence of control population of *Culex quinquefasciatus*

A A A T T T T G G C T G A T T T G G G C G G G C C T T T T T T A C T T G T T G

Sequence of KDR gene of natural population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG0)

Sequence of KDR gene of treated population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG5)

T A G T A A A A T T T A T C A A C T C C C A A T T G C T T T T T A T T T G C C
T A G T A A A A A T G T A T C A A C T C C C A T T G C T T T T T A T T T G C C

600

Sequence of control population of *Culex quinquefasciatus*

T A G T A A A A T T T T T T C A C T T C C C A T T G C T T T T T A T T T G C C

By comparing the two sequences (Sequence of KDR gene of natural population of *Culex quinquefasciatus* (DSenCqG0) and Sequence of KDR gene of treated population of *Culex quinquefasciatus*), we note differences in the bases between natural populations of *Culex quinquefasciatus* and those treated after 24 hours and died at positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17 shown with red color. These differences are also visible at positions 569, 571, 572, 573, 574, 575, 577, 578, 579, 582 and at the positions 603, 604, 605.

5. Discussion

The study report to the resistance of *Culex quinquefasciatus* mosquito. The study showed CL 50 and CL 90 (lethal concentrations 50 et 90) respectively of 9 mg/l and 14 mg/l after 48 hours for young instars larvae (1 and 2). Old instars larvae (3 and 4) of *Culex quinquefasciatus* larvae died respectively with the CL 50 and CL 90 of 14 mg/l and 20 mg/l. The CL 50 obtained in this study showed significant difference with those obtained with Hougard *et al.*, 1983. In fact, Hougard *et al.*, 1983 obtained 0,10 mg/l (CL 50) by treating *Culex quinquefasciatus* youngs instars larvae by *Bacillus thuringensis* ser. *Israelensis*. CL 50 obtained in this study is higher than CL 50 that Hougard *et al.* (1983) obtained in their study. So *Bacillus thuringensis* ser. *Israelensis* biopesticides is more effective than Suneem 1% biopesticides. However, CL 50 (9 mg/l) and CL 90 (14 mg/l) with youngs instars larvae, obtained in this study were similars to those obtained by

Ndione *et al.*, 2007. Ndione *et al.* (2007) obtained 8 mg/l by treating *Aedes aegypti* by Suneem 1%. The study also examined DNA sequences and among the knockdown (kdr) mutation in 1% Suneem (*Azadirachta indica*, A. Juss) resistance mosquito of *Cx. quinquefasciatus*. We found in this study a kdr genotype in *Cx. quinquefasciatus* after treatment with 1% Suneem after five generation. Determining insensitivity or resistance in *Culex quinquefasciatus* Suneem 1% (local biopesticide) electrophoresis revealed a kdr gene amplification voltage-dependent sodium channel in natural populations of *Culex quinquefasciatus* generation zero (G0 DSenCq) to 1000 bp, and population-level processed and died 24 hours after generation 1 (DSenCqG1) to 1000 bp and also in insensitive or resistant populations to Suneem after five generations G5 (DSenCqG5) to 1200 bp. These results obtained with *Culex quinquefasciatus* in this study are not similar with those of Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007). They found amplification of the kdr gene voltage-dependent sodium channel to 125 bp for *Aedes aegypti* mosquitoes resistant to pyrethroids. The difference between the results of Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) and those of this study can be explained by the difference of the species. Furthermore, the nucleotide sequences obtained from natural populations (*Culex quinquefasciatus* untreated Suneem by 1%) (DSenCqG0) and those treated and dead after 24h showed differences in the sequence of the bases at positions 17 and positions 602-605. Their analysis showed a result of a mutation of a base substitution of thymine for adenine one another. This shift will cause the replacement of a leucine (TTA) with phenylalanine (TTT). This mutation could cause insensitivity or even a resistance of *Culex quinquefasciatus* to Suneem 1%. These results are similar to the work of Singh *et al.* (2011). Indeed, the work of Singh *et al.* (2011) revealed the presence of two nonsynonymous mutations alternatives between (T and C) and (A and T) respectively at the 2nd and 3rd codon position. This is the origin of mutation of a Leucine (TTA) by a Serine (TCA) and by a phenylalanine (TTT). This mutation is the cause of resistance kdr (knockdown resistance) occurred after changing the voltage-dependent sodium channel. This insensitivity or resistance of the larvae of *Culex quinquefasciatus* treated could be explained by a selection pressure of pesticides used in treatment campaigns mosquitoes. The interpretation of the results of this study found is base to those of Sinègre *et al.*, 1976). According to Sinègre *et al.* (1976), the insensitivity or resistance of Culicidae populations is due to the selection pressure of agricultural pesticides that *Culex pipiens* are subjected in suburban, urban and rural habitats. Furthermore, the voltage-dependent sodium channel is the first site where most especially insecticides biopesticides act (Narahashi, 1996 and Sattelle *et al.* 1998) act. Down results from this study again support and confirm the results of Narahashi (1996) and Sattelle *et al.* (1998) for the work extraction, amplification and sequencing of DNA that *Culex quinquefasciatus* survived the treatment revealed a change in the conformation of the voltage-gated sodium channel that was at the origin of the Duty of some of the larvae of *Culex quinquefasciatus* treated Suneem after 5 generations (F5). Haubruge and Amichot (1998) in their study developed the main mechanisms responsible for resistance including behavioral resistance associated with the mobility of the insect, the physiological changes associated with the penetration kinetics, sequestration and excretion of insecticide, and that associated with activation biochemical detoxification systems. The results of this study are

consistent with a mechanism described by Haubruge and Amichot (1998) i.e. the physiological mechanism of resistance associated with the change in the kinetics of penetration. In this mechanism most often the kdr gene can be overexpressed and synthesized proteins prevent insecticide to kill mosquitoes by knock-down.

Knipple *et al.*, 1994 and Williamson *et al.*, 1993 in their work on flies showed mutation corresponding to a substitution of a leucine by a phenylalanine (Phe to Leu) resulting from a single nucleotide polymorphism. This mutation corresponds to a resistance of kdr-type. Results Knipple *et al.* (1994) and Williamson *et al.* (1993) are similar to those of the study. They come once again confirm and support our results.

6. Conclusion

Study of the larvae stains of *Culex quinquefasciatus* survived to the treatment to Suneem 1% after five generations revealed a resistance due to a mutation of kdr gene. The mutation due to a replacement of leucine (TTA) to phenylalanine (TTT). The mutation caused overexpression protein of sodium channel gene that is the main site of biopesticide.

Acknowledgement

The author thanks Pr. Ioan Moglan, Dr Lucian Gorgan, Dr Lucian Fusu (University Ioan Cuza din Iasi, Romania), Bernard Marchand (University of Cortes) for technical help in the electronic microscopy and the PCR techniques.

References

Brown A.W.A., Abeni Z.H. 1960. Cross resistance characteristics of a Malathion tolerant strain developed in *Aedes aegypti*. *Mosq. News*, 23 (4): 341-345.

Hamon J., Garret-Jones C. 1963. La résistance aux insecticides chez les vecteurs majeurs du paludisme et son importance opérationnelle. *Bull. Org. Mond. Santé* (28) : 1-24.

Haubruge E., Amichot M. 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2 (3): 161-174.

Hougard, J.M., Duchon, S., Zaim, M. and Guillet, P., 1983. Bifenthrin: a useful pyrethroid insecticide for treatment of mosquito nets. *J. Med. Entomol.* 39, 526-533.

Jean-Marc Hougard, Frédéric Darriet and S. Bakayoko (1983). Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* Say, 1823 et *Anopheles gambiae* Giles, 1902 s.l. (*Diptera : Culicidae*) en Afrique de l'Ouest. *Cah. ORSTOM, Ser. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XXI, n°2 : 111-117.

Knipple, D.C., Doyle, K.E., Marsella-Herrick, P.A., and Soderlund, D.M. 1994. Tight genetic linkage between the kdr insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91; 2483–2487.

Lewallen L.L., Brown A.W.A, Gilles P.A. 1963. Organophosphorus resistance in *Aedes nigromaculis* in California. *Mosq. News*, 23, 4: 341-345.

Martine-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Berge JB, Pasteur N & Pauron D (1999). Voltage dependent Na⁺ channels in pyrethroid resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. Pesticide Science 55, 1012-1020.

Mouchet J., Elliot R., Gariou J., Voelckel J & Varrieras J. 1960. La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied et les problèmes d'hygiène au Cameroun. Médecine tropicale. 20 (4): 448- 455.

Narahashi T., 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides ; Pharmacol. Toxicol. 78 : 1-14.

Ndione R.D., Faye O., Ndiaye M., Dieye A. & Afoutou J.M. 2007. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica*, A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. Journal of African Biotechnology. 6(24): 2846-2854.

Ndione R.D., Seye F., Ndiaye M. & Sow I. 2006. Effets histopathologiques des produits du neem (*Azadirachta indica*, A. JUSS) sur les larves de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (*Diptera* : *Culicidae*). Dakar Médical 51(2) : 107-112.

Saavedra-Rodriguez K., Urdaneta-Marquez L., Rajatileka S., M. Moulton*, A. E. Flores, I. Fernandez- Salas, J. Bisset, M. Rodriguez, P. J. McCall, M. J. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway and W. C. Black IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology 16 (6): 785–798.

Sattelle D.B., Yamamoto D.1998. Molecular targets of pyrethroid insecticides. Adv. Insect. Physiol. 20: 147-213.

Seye F., Ndione R. D., Ndiaye M. 2006 a. Effets larvicides des produits de neem (Huile de neem pure et Neemix) comparés à deux insecticides chimiques de synthèse (la Deltaméthrine et Fénitrothion) sur les larves de moustiques *Culex quinquefasciatus* (*Diptera* : *Culicidae*). Journal des Sciences et Technologies. 4 (1) : 27-36.

Seye F., Ndione R.D. et Ndiaye M. 2006 b. Étude comparative de deux produits de neem (Huile et Poudre) sur les stades préimaginaux de moustique *Culex quinquefasciatus* (*Diptera* : *Culicidae*). Afrique Science. 02 (2): 212-225.

Sinegre G., Jullien J.L. & Crespo O. 1976. Résistance de certaines populations de *Culex pipiens* (L) au Chlorpyrifos (DursbanR) en Languedoc-Roussillon (France). Cah. O.R.S.T.O.M., Sér. Ent. Méd. Et Parasitol., vol. XIV, n°1:49-59.

Singh O.P., Dykes C.L., Lather M., Agranat O.P. & Adak T. 2011. Knowdown resistance (kdr)-like mutations in the voltage-gated sodium channel of a malaria vector *Anopheles stephensi* and PCR essays for their detection. Malaria journal. 10: 5-9.

Titre : Contrôle du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) par un biopesticide le Suneem 1% (*Azadirachta indica*, A. juss): études du niveau de sensibilité, de l'histopathologie et de la résistance.

Nom du Candidat : Raymond Demba NDIONE

Nature du mémoire : Thèse de Doctorat de Biologie Animale, spécialité : Entomologie

Jury de soutenance :

Président : Professeur Omar Thiom THIAW (UCAD, FST, Dakar)

Rapporteurs : Professeur Ousmane FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Professeur Ngor FAYE (UCAD, FST, Dakar)

Professeur Ioan MOGLAN (UAIC, FB, Roumanie)

Directeur De Thèse Professeur Mady NDIAYE (UCAD, FST, Dakar)

Examineur Dr. Malick DIOUF (UCAD, FST, Dakar)

RESUME : *Culex quinquefasciatus* constitue un véritable problème de santé publique de par les maladies qu'il transmet et les nuisances (piqûre, bourdonnement) qu'il engendre aux hommes et aux animaux. Et le contrôle de ce vecteur par le Suneem 1% pourrait être un bon moyen pour lutter efficacement contre ces maladies. C'est dans ce contexte que s'est inscrite cette étude qui a comme objectif le contrôle du *Culex quinquefasciatus* par l'utilisation du Suneem. Pour atteindre ce but, environ 3500 œufs de *Culex quinquefasciatus* (une barquette dans 20 ml d'eau distillée dans chaque boîte de pétri) ont été traités avec différents volumes de Suneem 1% (0,01 ml, 0,02 ml, 0,03 ml, 0,04 ml, 0,05 ml, 0,06 ml) et une boîte de témoin (20 ml d'eau distillée). Aussi, 3000 larves (stades 1, 2, 3 et 4) de *Culex quinquefasciatus* ont été traitées par le Suneem 1% avec des concentrations allant de 2mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l ; 10 mg/l ; 12 mg/l ; 14 mg/l ; 16 mg/l, 18 mg/l à 20 mg/l). Les larves mortes après quelques heures de traitement sont traitées par la technique de routine de la microscopie électronique Les larves résistances (5 générations) et celles témoins sont fixées puis analysées par pcr pour déterminer des gènes de résistance. Les œufs de *Culex quinquefasciatus* sont éclos à 82% à $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l et à 30% à $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 24 heures). Par la suite, nous avons enregistré un taux d'éclosion des œufs de 81% à $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 48 heures). Un taux d'éclosion à 50% a été obtenue entre les concentrations $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 48 heures). La concentration de $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l a entraîné un faible taux d'éclosion de 2%. Les œufs ont éclos à 98% à $10 \cdot 10^{-3}$ mg/l d'azadirachtine (après 72 heures). Un taux d'éclosion à 50% a été obtenu dans la gamme de concentrations entre $20 \cdot 10^{-3}$ mg/l et $30 \cdot 10^{-3}$ mg/l (après 72 heures). La concentration à $60 \cdot 10^{-3}$ mg/l a donné un faible taux d'éclosion de 0,40%. Par contre, les larves de stades jeunes (stades 1 et 2) de *Culex quinquefasciatus* ont subi une mortalité de 50% à 12 mg/l d'azadirachtine (CL50 après 24 heures) et entre 8 et 10 mg/l (après 48 heures). La CL90 a été obtenue à 18 mg/l après 24 heures de traitement avec le Suneem 1% et à 14 mg/l (après 48 heures). Les CL50 et CL90 n'ont pas été obtenue avec le traitement des stades âgés (stades 3 et 4) de *Culex quinquefasciatus* avec le Suneem 1%. Les concentrations 14 et 20 mg/l ont entraîné 48% de mortalité (environ 50%) de *Culex quinquefasciatus* (après 48 heures). Les coupes histologiques des larves mortes ont montré des cellules épithéliales intestinales hypertrophiées, des excroissances au niveau apical. Les cellules sont désorganisées donnant un épithélium rompu. Enfin, on observe des nécroses cellulaires Le tissu musculaire et la cuticule sont aussi détruits. Par ailleurs, les moustiques qui ont résisté aux traitements après 5 générations ont montré par électrophorèse une amplification du gène kdr voltage-dépendant des populations naturelles de *Culex quinquefasciatus* génération zéro (DSenCq G0) à 1000 pb, des populations traitées et mortes après 24 heures génération 1 (DSenCqG1) à 1000 pb et des populations insensibles voire « résistantes » au Suneem après cinq générations G5 (DSenCqG5) à 1200 pb. L'analyse des séquences du gène kdr des moustiques témoins et traités a montré des différences dans les bases au niveau des positions 1 à 17, 569 à 582, et 602 à 605. Après la position 1090, la séquences du gène kdr des moustiques traités est la plus longue. Tous ces résultats, nous permettent de dire que le Suneem 1% (biopesticide local) est efficace dans la lutte contre les moustiques et dans la prévention des maladies vectorielles. Seulement son utilisation doit se faire de manière ponctuelle pour éviter les pressions de sélection qui sont souvent à l'origine du développement de certains gènes responsables de la résistance.

Mots-clés : Suneem 1% (*Azadirachta indica*), *Culex quinquefasciatus*, traitement, dose létales 50 et 90 (DL₅₀ et DL₉₀), toxique, sensibilité, nécroses cellulaires, résistance, gène kdr.