

District sanitaire de Kédougou

II.1. Présentation de la zone d'étude:

L'étude a été effectuée dans trois districts sanitaires du sud-est du Sénégal (Kédougou, Vélingara et Dianké Makha). Le choix de cette partie du pays se justifie par la situation épidémiologique du paludisme. En effet, pour une population de 3 328 782 habitants englobant les trois régions Kédougou, Kolda et Tambacounda, avec 87% des cas de paludisme, 71% des décès toute tranches d'âge confondues et 81% des décès chez les enfants de moins de 5 ans. La zone présente une prévalence la plus élevés avec de 103,49 pour 1000 habitants (PNLP, 2017). A cela s'ajoute des niveaux élevés de résistance des populations de vecteurs aux molécules d'insecticides utilisées dans la lutte anti-vectorielle du paludisme (Niang *et al.*, 2016).

Le district sanitaire de Kédougou est situé dans la région de Kédougou qui est limitée à l'Est par la République du Mali, au Sud par la République de Guinée et au Nord et à l'Ouest par la région de Tambacounda. Il couvre une superficie de 16 896 km² pour une population estimée à 1 782 69 habitants (ANSD, 2013). La région présente un climat de type soudano-guinéen. Les températures sont généralement élevées, avec des maxima variant entre 34°C et 42°C et des minima, entre 21°C et 25°C. La période de basses températures couvre les mois de juillet à février, avec des minima aux mois de décembre et de janvier. La période de fortes températures est observée de mars à juin. L'humidité relative est très élevée pendant la saison des pluies (hivernage) où elle dépasse 97% entre août et octobre. De janvier à mars, elle baisse pour atteindre une valeur minimale de 10% (ANSD, 2014). Le réseau hydrographique est dense et dépend très fortement de la pluviométrie. La région est arrosée par la Falémé et le fleuve Gambie et ses affluents dont le Niokolo. La région de Kédougou est l'une des régions les plus pluvieuses du pays, avec au moins 1 300 mm/an. L'hivernage dure environ six (06) mois, de mai à octobre. Il en est de même pour la saison sèche de six (06) mois qui va de novembre à avril. Toutefois, cette pluviométrie se caractérise par une grande variabilité spatio-temporelle, les mois d'août et septembre étant les plus pluvieux. Les principales cultures de la région sont le mil, le sorgho, le maïs, le riz, le fonio, l'arachide et le coton.

❖ District sanitaire de Dianké Makha

Le district sanitaire de Dianké Makha est situé dans la région de Tambacounda. Dont la superficie est de 42 706 km². En 2015, la population de la région de Tambacounda et celle de Dianké Makha est estimée respectivement à 730 473 et 28 560 habitants (ANSD, 2018).

La région de Tambacounda est limitée, au Nord par la République Islamique de Mauritanie et les régions de Louga et de Matam, au Sud par la région de Kédougou, à l'Est par la République du Mali et la République Islamique de Mauritanie et à l'Ouest par la République de Gambie et les régions de Kolda et Kaffrine. Elle est arrosée par un réseau hydrographique très important constitué par le fleuve Sénégal, la Falémé, le fleuve Gambie ainsi que plusieurs affluents et marigots (ANSD, 2018).

Le district de Dianké Makha se situe entre les isohyètes 450 et 800 mm .Il figure parmi les sites les plus pluvieux de la région. La saison des pluies dure 4 à 5 mois (les mois d'août et septembre étant les plus pluvieux) et son installation s'effectue de manière échelonnée du Sud au Nord. Deux types de climat prévalent dans la région : soudano-sahélien et soudano-guinéen. L'agriculture occupe une place importante dans les activités socioéconomiques de la population. Les principales spéculations cultivés sont : l'arachide, le coton, le mil, le maïs, le sorgho, le riz, le niébé, le fonio, la banane, le sésame.

❖ District sanitaire de Vélingara

Le district sanitaire de Vélingara est situé dans la région de Kolda. Qui est composée de trois départements: Kolda, Médina Yoro Fouta et Vélingara. Le département de Vélingara est le plus vaste, avec 40% de la superficie régionale, suivi de Médina Yoro Fouta 34% et de Kolda 26%. Le climat est de type soudano guinéen recevant des précipitations qui s'étalent de juin à octobre, avec une intensité maximale sur la période août-septembre. Les précipitations moyennes varient entre 700 mm et 1300 mm. Les températures moyennes mensuelles les plus basses sont enregistrées entre décembre et janvier et varient entre 25°C et 30°C, les plus élevées sont notées entre mars et septembre avec des valeurs comprises entre 30°C et 40°C (ANSD, 2017).

Le réseau hydrographique est composé d'un cours d'eau principal, le fleuve Casamance et ses affluents. Sa rive droite est longée par le marigot de Saré Kouyatel tandis que la rive gauche renferme les marigots de Thiango Dianguina, de Khorine et de Dioulacolon. La zone de Kounkané est arrosée par le fleuve Kayenga et son affluent l'Anambé. Le barrage de Ndiandouba et celui de l'Anambé, élevés respectivement sur ces cours d'eau, font que la zone dispose de l'eau de façon continue. La région dispose de terres cultivables estimées à 2 millions d'hectares. Les activités agricoles mobilisent environ 80% des actifs de la région sur une période de 8 à 9 mois de l'année. Les principales spéculations sont, pour les cultures vivrières, le mil, le maïs, le sorgho, le riz, le fonio et pour les cultures de rente, l'arachide, le coton, le niébé, le manioc et le sésame (ANSD, 2017).

II.2. Choix des sites d'étude

Nous avons travaillé dans neuf sites, à raison de trois par district (figure 2). Les sites ont été choisis pour leurs caractéristiques éco-épidémiologiques et entomologiques. A cela s'ajoute la persistance notoire de la résistance aux différentes molécules d'insecticides (Niang et *al.*, 2016).

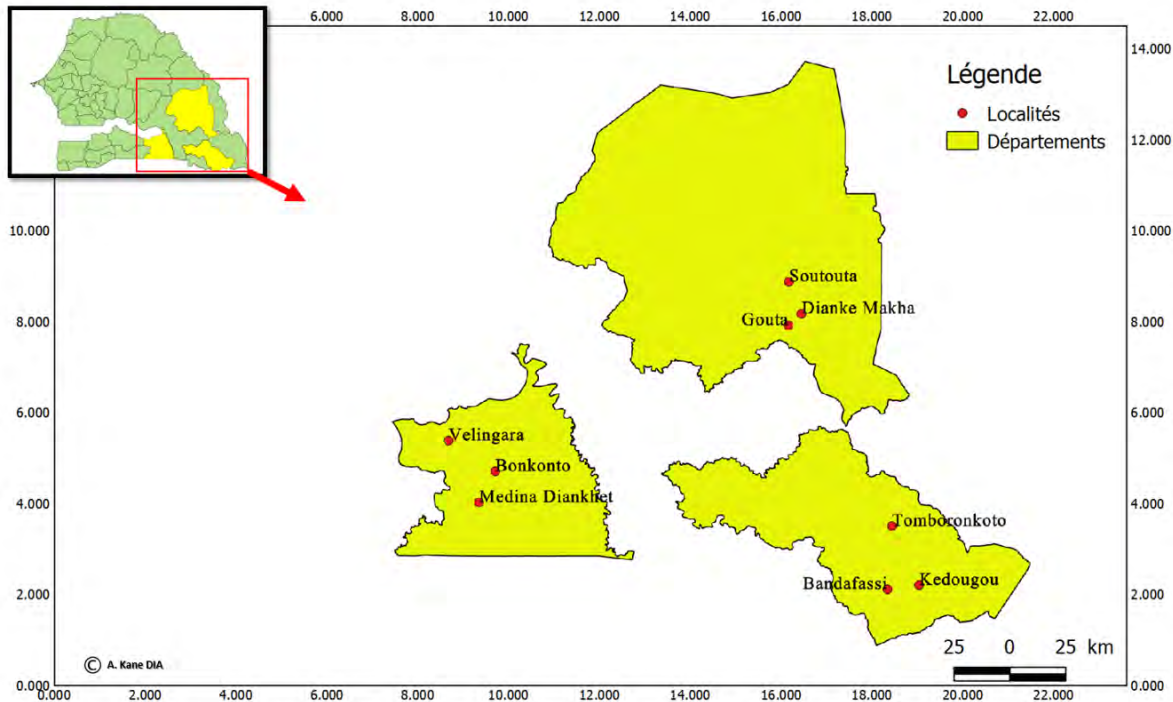


Figure 2: Figure montrant emplacement des sites d'étude

II.3. Collecte et traitement des larves

II.3.1. Matériel de collecte des larves

Après une prospection des points d'eau de surface (potentiel gîtes larvaires), les larves d'anophèles, reconnaissables par leur position parallèle à la surface de l'eau, (WHO, 2013) sont prélevées des gîtes positifs.

Les larves d'anophèles préfèrent l'eau claire et propre (figure 3A). Elles sont récoltées à l'aide d'une louche ou d'un filet (figure 3C).

Le matériel est constitué par des louches, des bacs en plastique, des pipettes en plastique, des seaux, du ruban adhésif et une gamme de passoirs à mailles fines (figure 3B). Les échantillons collectés sont d'abord traités pour enlever les prédateurs ensuite transvasés dans un seau et transportés au laboratoire pour l'élevage des larves.

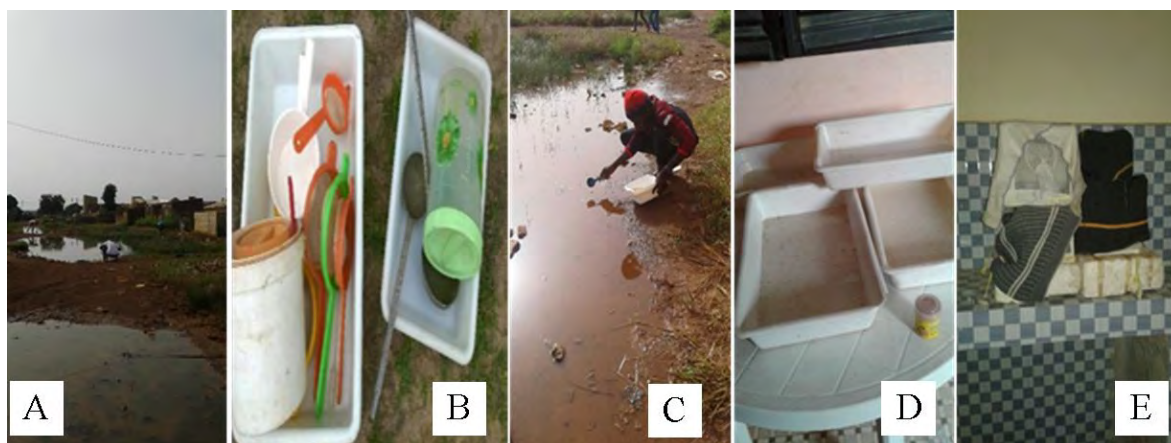


Figure 3 : Collecte et élevage des larves : (A) : Gîtes larvaires, (B) : le matériel de collecte (C) : Collecte des larves, (D) : Bacs en plastique avec des larves et (E) : Cage d'éclosion des adultes.

II.3.2. Elevage des stades pré-imaginaux

Les larves récoltées sont triées et réparties par stade de développement dans des bacs étiquetés, tout en évitant le surnombre (figure 3D). Les larves sont élevées dans l'eau des gîtes d'origine qui est progressivement remplacée par l'eau du robinet. L'eau des bacs est renouvelée tous les deux jours pour éviter tout développement de moisissures pouvant entraîner la mort des larves. Les larves sont nourries avec un aliment pour alevin (Mikrovit®). Les bacs sont inspectés tous les jours et les nymphes récoltées dans des cristallisoirs. A maturité, les nymphes sont transférées dans des cages d'éclosion (figure 3E).

II.3.3. Elevage des adultes

L'élevage se fait dans des cages cubiques de cadre en fer, recouvert de tulle moustiquaire ouvert à l'extérieur sur l'une des faces par un manchon. A l'éclosion, les adultes sont quotidiennement nourris avec un tampon imbibé d'une solution d'eau sucrée à 10%. Afin de maintenir les conditions thermo-hygrométriques optimales à la survie des adultes (température de 25-28°C et humidité relative de 78-80%), les cages sont soigneusement recouvertes d'une serpillière humidifiée (figure 3E).

II.4. Tests de sensibilité et évaluations de l'intensité de la résistance avec les kits OMS

Le test biologique OMS de sensibilité est un test exposition-réponse directe. Il mesure la mortalité des moustiques lorsqu'ils sont exposés à une concentration standard connue d'un insecticide donné, pour déterminer la proportion de la population de vecteurs qui est résistante (concentration discriminante) à cet insecticide. Cette évaluation se fait soit à une concentration discriminante, soit l'intensité de la résistance (5X et 10X).

II.4.1. Matériel biologique

Selon le protocole standard de l'OMS les tests de sensibilité s'effectuent sur des anophèles femelles à jeun, âgés de 3 à 5 jours.

II.4.2. Matériel de test

Lors des tests de sensibilité, nous avons utilisé le kit OMS : un kit OMS comprenant des cylindres OMS à pastille rouge et pastille verte, des anneaux (acier et bronze), des glissières, deux aspirateurs à bouche, un thermo-hygromètre, des fiches de tests, un rouleau de ruban adhésif, un chronomètre, des serpillières et des papiers imprégnés d'insecticides (figure 4A)

II.4.3. Molécules testées

Le tableau I présente les insecticides et les doses testés.

Tableau I : Insecticides et doses testées

Famille	Molécules	Doses		
		1X	5X	10X
Pyréthrinoïdes	Perméthrine	+	+	+
	Deltaméthrine	+	+	+
	Alphacyperméthrine	+	+	+
	Lambdacyhalothrine	+	+	+
Organochlorés	DDT	+	-	-
Organophosphorés	Primiphos-méthyl	+	-	-
Carbamates	Bendiocarb	+	+	+

(+) = testés

(-) = non testés

II.4.4. Les tests biologiques effectués

II.4.4.1. Le test standard avec tubes OMS

II.4.4.1.1. Procédure du test

Le test se déroule selon le protocole standard de test de sensibilité (OMS, 2013). Des papiers blancs indemnes d'insecticide de dimension (12 cm x15 cm) ont été introduits dans les tubes d'observation à pastille verte, fixés par des anneaux en acier. Entre 120 à 150 moustiques femelles ont été aspirés d'une cage à moustique puis distribués à raison de 20 à 25 moustiques par tube dont deux serviront de témoins (Figure 4B). Les tubes d'observation sont placés en position verticale puis recouverts d'une serpillière humide pendant 1 heure. À la fin de la période d'observation, tous les moustiques mort ou incapables de voler sont retirés. Les tubes d'exposition à pastille rouge sont préparés de la même manière que les tubes d'observation. Les papier imprégnée d'insecticide sont plaqué contre les parois internes des tubes à maintenus avec les anneaux en bronze, de manière à ce que l'étiquette imprimée sur les papiers soit visible de l'extérieur. Les tubes d'exposition ainsi préparé sont fixés sur les glissières des tubes d'observation. Les moustiques sont transférés vers les tubes d'exposition en soufflant doucement. Le temps d'exposition est d'une (1) heure durant laquelle les moustiques Knock down sont enregistrés à 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes (Figure 4C). A la fin du temps d'exposition, les moustiques sont transférés à nouveau dans les tubes d'observation avec du jus sucré à 10% pour leur alimentation et le tout recouvert d'une serpillière humide (Figure 4D). La température et l'humidité ont été prises au début et à la fin de chaque étape (observation et exposition). La lecture de la mortalité immédiate est faite à 80 minutes et celle différée à 24h après exposition.



Figure 4: Test de sensibilité avec kit OMS : (A) : Matériel de test, (B) : Introduction des moustiques dans les tubes tests OMS, (C) : Lecture de mortalité et (D) : Période d'observation post-exposition

II.4.4.1.2. Critères de validation des tests

Le calcul des taux de mortalité est fait par le rapport du nombre de moustiques morts sur l'effectif total de l'échantillon, rapporté en pourcentage. Le test est invalide si la mortalité des lots témoins est supérieure à 20%. La mortalité des lots testés est corrigée par la formule d'Abbott (OMS, 2013b) si celle des témoins est comprise entre 5 et 20%. Pour une mortalité des témoins inférieure à 5% aucune correction n'est nécessaire.

$$\text{Mortalité observée} = \frac{\text{nombre total de moustiques morts}}{\text{nombre total de moustiques testés}} \times 100$$

Formule d'Abbott :

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{mortalité des tests} - \% \text{mortalité témoins}}{100 - \% \text{mortalité témoins}} \times 100$$

II.4.4.1.3. Interprétation des résultats

❖ Détermination du statut (dose discriminantes 1X)

- Si la mortalité des spécimens exposés est supérieure ou égale à 98%, la population est considérée comme sensible à l'insecticide testé.
- Si la mortalité est comprise entre 90 et 97%, la résistance est possible et devra être confirmée par un nouveau test.
- Si la mortalité des spécimens exposés est inférieure à 90%, la résistance est confirmée.

Quand la résistance est confirmée, les spécimens seront soumis à des tests supplémentaires pour évaluer l'intensité de ce dernier.

❖ Détermination de l'intensité de la résistance

✓ **Sensibilité à la dose (5X)**

- Si la mortalité est supérieure ou égale à 98%, on a une résistance de faible intensité.
- Si la mortalité est inférieure à 98%, la résistance est d'intensité modérée à intensité forte.

✓ **Sensibilité à la dose (10X)**

- Si la mortalité est supérieure ou égale à 98%, on a une résistance d'intensité modérée.
- Si la mortalité est inférieure à 98%, la résistance est de forte intensité.

II.4.4.2. Tests biologiques avec synergistes et insecticides

Le test biologique avec synergiste couplé à un insecticide est un test exposition-réponse directe, il mesure l'effet d'une pré-exposition à un synergiste sur l'expression de la résistance aux insecticides et permet de déterminer l'implication des mécanismes biologiques dans la résistance.

Le matériel biologique et le matériel de test sont les mêmes que ceux précédemment cités.

II.4.4.2.1. Molécules testées

Les couples synergistes/insecticides utilisés sont PBO (4%)/Perméthrine (0,75%) et PBO/Deltaméthrine (0,05%).

II.4.4.2.2. Procédures du test

Il a été utilisé quatre tubes d'observation marqués par une pastille verte et contenant des feuilles de papier blanc propre indemne d'insecticide à raison d'une feuille par tube. Les tubes ont été chargés de 20 à 25 moustiques par tube, puis mis en observation durant une heure. Les tubes d'exposition à pastille rouge ont été préparés de la même façon en utilisant cinq tubes d'exposition (quatre marqués à pastille rouge et un marqué d'une pastille jaune). Les deux premiers tubes d'exposition (pastille rouge) ont été tapissés d'une feuille de papier imprégné d'insecticide (à la concentration discriminante), les deux autres avec une feuille de papier imprégnée de PBO à 4%. Le tube à pastille jaune qui serve de contrôle est tapissé d'un papier imprégné huile. Les papiers ont été fixés avec des anneaux en bronze et les tubes correspondant étiquetés. A la fin de l'heure d'observation, les moustiques de deux tubes d'observation ont été transférés respectivement dans les deux tubes avec PBO pour une exposition d'une heure. A la fin de cette exposition au PBO, les moustiques d'un des tubes PBO sont retirés et transférés dans leur tube d'observation d'origine tandis que l'autre du tube PBO seront soumis à l'insecticide. Pour l'un des deux tubes témoins restant les moustiques ont été directement transférés dans le tube à l'insecticide et pour l'autre ils ont été transférés dans le tube à pastille jaune. Après une heure d'exposition, les trois échantillons de moustiques «à insecticide seul, PBO puis insecticide et les témoins» ont été transférés de nouveau dans leur tube d'observation respective et les Knock down ont été enregistrés sur les fiches test. Les moustiques ont été gardés et nourris avec du coton imbibé de jus sucré pendant 24h aux conditions de température et d'humidité requises pour le test standard de l'OMS. A l'issue de ces 24h, la mortalité différée a été enregistrée dans les fiches. Cette expérience est répétée trois fois pour avoir l'effectif à analyser.

II.4.4.2.3. Critères de validation des résultats

Les tests biologiques sur un couple PBO/insecticide sont valides si la mortalité des lots PBO seul est inférieure à 10% et la mortalité des lots témoins inférieure à 20%. Il est corrigé par la formule d'Abbott si mortalité des lots témoins est comprise entre 5% et 20%. Les tests sont annulés si la mortalité des lots témoins est supérieure à 20% ou celle des lots PBO seul supérieure à 10%.

II.4.4.2.4. Interprétation des résultats

Lorsque le taux de mortalité des moustiques exposés à l'insecticide seul est inférieur à 90%, l'effet du PBO peut être interprété comme suit.

- Si le taux de mortalité des moustiques exposés « au PBO puis insecticide » est supérieur ou égale à 98%, on a un rétablissement complet de la sensibilité, supposant qu'un mécanisme de résistance impliquant les mono oxygénases est pleinement responsable de l'expression du phénotype résistant dans la population testée.
- Si le taux de mortalité des moustiques exposés « au PBO puis à un insecticide » est supérieur aux taux de mortalité des moustiques exposés à « un insecticide seul », mais inférieure à 98%, on a un rétablissement partiel de la sensibilité, supposant que le mécanisme impliquant les mono oxygénases n'est que partiellement responsable de l'expression du phénotype résistant et que d'autres mécanismes de résistance sont impliqués.
- Si le taux de mortalité des moustiques exposés « au PBO puis à un insecticide » est inférieur ou égal au taux de mortalité des moustiques exposés à « un insecticide seul », on a une absence de rétablissement de la sensibilité, signifiant que le phénotype de résistance détecté n'implique pas une détoxification basée sur les mono oxygénases.
- Si le taux de mortalité des moustiques exposés à « un insecticide seul » est supérieur ou égal à 90%, l'effet du PBO ne peut être interprété de façon précise.

II.4.5. Traitement et conservation des moustiques

Les moustiques survivants et morts à la fin du test ont été triés séparément, puis identifiés morphologiquement sous une loupe binoculaire en utilisant les clés conventionnelles (Gillies et de Meillon 1968 ; Diagne *et al.*, 1994). Les moustiques survivants ont été récupérés après avoir été endormis avec du chloroforme et mis individuellement dans des tubes Eppendorf. Tous les moustiques morts, dix ont été conservés individuellement dans des tubes Eppendorf contenant

un dessiccateur (silicagel) le reste est regroupé en lots de cinq. Les échantillons sont rangés dans des boîtes de rangement et conservés à -20°C jusqu'au traitement au laboratoire.

II.5. Traitement au laboratoire

Selon le phénotype (mort ou survivant) un sous échantillon de 100 moustiques a été traité par district et par doses (dose discriminante, 5 et 10 fois cette dernière) par l'identification des espèces pour l'identification moléculaire des spécimens *An. gambiae* s.l. L'analyse moléculaire s'effectue suivant trois étapes : extraction de l'ADN, amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR), et la révélation sous lumière ultraviolette.

II.5.1. Extraction de l'ADN

L'extraction a été faite au CTAB 2% et comprend quatre étapes : le broyage (mécanique), la lyse cellulaire, la purification et l'élution. Chaque moustique a été broyé individuellement dans 200 µl de CTAB 2%. Le broyat obtenu a été incubé au bain-marie à 56°C pendant 1 heure pour la lyse cellulaire et la libération de l'ADN. Après incubation, l'ADN est séparé des autres constituants indésirables à l'aide du chloroforme, précipité avec de l'isopropanol puis lavé avec de l'éthanol 70%. L'ADN fixé au fond des tubes est ensuite séché au speed-vac puis élué dans 200 µl d'eau ultra pure.

II.5.2. Amplification de l'ADN par PCR

II.5.2.1. Principe et procédure

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie par la technique inspirée d'amplification in-vitro des cellules. Elle est constituée de trois phases successives et répétées en plusieurs cycles : une phase de dénaturation par chauffage pour séparer les deux brins d'ADN, une phase d'hybridation ou de fixation des amorces à la matrice et enfin une phase d'élongation grâce à l'action de l'ADN polymérase.

II.5.2.2. Identification des espèces du complexe *gambiae*

L'amplification par PCR de l'ADN extrait a été faite selon la méthode de (Wilkins *et al.*, 2006). L'identification moléculaire des espèces du complexe *gambiae* a été effectuée sur les spécimens testés au DDT et aux pyréthrinoïdes. L'amplification des séquences d'intérêt a été réalisée dans un volume réactionnel de 26,05 µl contenant 11,1µl d'eau ultra pure, 5µl de tampon 5X coloré, 2,5 µl de dNTP, 0,3 µl de MgCl₂, 1µl de chaque amorce, 0,15µl de Taq

polymérase et 1µl d'extrait d'ADN. Les conditions de PCR sont : une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes suivie d'une phase d'amplification (30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, l'hybridation à 58°C pendant 30 secondes, d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes, et une élongation finale de 72°C pendant 5 minutes). Les amplicons ont ensuite été conservés à 4°C.

Tableau II : Séquences des amorces pour l'identification des espèces du complexe *gambiae* d'après (Wilkins *et al.*, 2006)

Amorces	Séquences
IMP-UN :	5'-GCTGCGAGTTGTAGAGATGCG-3'
AR-3T :	5'-GTGTTAAGTGTCTTCTCCgTC-3'
GA-3T :	5'-GCTTACTGGTTTGGTCGGCA _t GT-3'
ME-3T :	5'-CAACCCACTCCCTTGACGaTG-3'
IMP-S1:	5'-CCAGACCAAGATGGT TCG _c TG-3'
IMP-M1:	5'TAGCCAGCTCTTGTCCACTAGT _t TT-3'

II.5.2.3. Recherche de mutations Kdr

La recherche des mutations Kdr West et East a été effectuée sur les échantillons d'*An. gambiae* s.l. testés au DDT et aux pyréthrinoïdes. Les conditions de PCR sont les suivantes : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivie de 35 cycles composés chacun d'une dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une hybridation des amorces pendant 30 secondes à 59°C et à 57°C, respectivement pour les Kdr West et East, d'une élongation de 30 secondes à 72°C, et enfin d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C. L'amplification par PCR de l'ADN extrait a été effectuée selon la méthode de (Hyunh *et al.*, 2007).

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour la recherche des mutations Kdr West et Kdr East d'après Hyunh *et al.*, (2007)

Amorces	Séquences
IPCF:	5'-GATAATGTGGATGATTCCCCGACCATG-3'
AltRev:	5'-TGC CGTTGGTGCAGACAAGG ATG-3'
WT:	5'GGTCCATGTTAATTTGCATTACTTACGA _a TA-3'
West:	5'GGTCCATGTTAATTTGCATTACTTACGA _a TA-3'
East:	5'-CTTGGCCACTGTAGTGATAGGAAA _a TC-3'

II.5.2.3.1. Amplification de la mutation Kdr West

L'amplification des séquences a été réalisée dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant 8,8 µl d'eau ultra pure, 5 µl de tampon 5X coloré, 2,5 µl de dNTP, 0,5 µl de MgCl₂ supplémentaire, 1 µl de chaque amorce à l'exception de l'amorce West dont le volume est 3 µl 0,2 µl et 2 µl d'extrait d'ADN.

II.5.2.3.2. Amplification de la mutation Kdr East

L'amplification des séquences a été réalisée dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant 6,8 µl d'eau ultra pure, 5 µl de tampon 5X coloré, 2,5 µl de dNTP, 0,5 µl de MgCl₂, 2 µl de chaque amorce, 0,2 µl de Taq polymérase plus 2 µl d'extrait d'ADN.

II.5.2.4. Amplification de la mutation Ace-1

L'amplification des séquences d'ADN a été réalisée dans un volume réactionnel total de 21 µl par micro tube contenant : 10 µl d'eau ultra pure, 4 µl de tampon 5X coloré, 1,5 µl de dNTP, 0,3 µl de MgCl₂, 1 µl de chaque amorce, 0,2 µl de Taq polymérase plus 1 µl d'extrait d'ADN.

Tableau IV: séquences des amorces utilisées pour la recherche des mutations du gène Ace1 d'après Weill *et al.*, (2004)

Amorces	Séquences
CDCACEF :	(GGT GGA CGT GTG TGG CTC)
CDCACER :	(CTA CCG TAG CGC AAG GTT C)
CDCWT :	(TGT GGA TCT TCG GCG tCG)
CDCG119SR :	(CGG TGC CGG AGT AGA AtC T)

II.5.3. Migration et révélation

La migration des amplicons a été effectuée sur gel d'agarose (2%) contenant 2g d'agarose plus 100ml de Tris Borate EDTA 1X (TBE). Le gel est coulé dans un moule avec des peignes déjà fixés. Une fois bien solidifiés et les peignes délicatement retirés, le gel a été placé dans une cuve à migration remplie de TBE 1X jusqu'à la limite indiquée. Un mélange de tampon coloré et de 5 µl d'amplicon a été distribué avec précaution dans les puits. Un volume de 3- 5 µl d'une solution de marqueur de taille à 100pb a été introduit dans le premier et le dernier puits alors que le témoin négatif et les témoins positifs ont été distribués à partir du deuxième puits. Après la distribution des amplicons, le générateur est réglé à 80 volts, 400 milliampères et a été mise en marche pour la migration du gel pendant 90 minutes. Un Gel Doc relié à un ordinateur a ensuite permis de visualiser les bandes fluorescentes pour l'annotation et la sauvegarde des photos.

II.5.4. Interprétation des résultats

- La taille des bandes attendu pour l'identification des différentes espèces du complexe *An. gambiae* s.l. est de :
 - 221pb correspond à *An. gambiae* ;
 - 387pb correspond à *An. arabiensis* ;
 - 426pb correspond à *An. coluzzii* ;
 - 528pb correspond à *An. melas*
- Les nombres de paires de bases pour la recherche des mutations Kdr, trois bandes sont attendues :
 - Une bande commune à 314pb ;
 - Une bande susceptible à "214pb" ;
 - Une bande résistante à "156pb".
- Les nombres de paires de bases pour la recherche de la mutation Ace-1, trois bandes sont attendues :
 - Une bande commune à 456pb ;
 - Une bande susceptible à "96pb" ;
 - Une bande résistante à "288pb".