

Collecte des larves et élevage des moustiques

II.2.1 Méthode de collecte

Les larves et nymphes d'*An. gambiae s.l.* ont été prélevées, à l'aide de louches, au niveau de gîtes larvaires prospectés et géo-référencés. Des bacs en plastique ont été utilisés pour recueillir les larves récoltées, et des passoirs à mailles adaptées pour les filtrer. Le tri des larves et nymphes ainsi que la purification des bacs (élimination des larves de *Culicinae* et potentiels prédateurs), a été effectué avec des pipettes. Transvasées dans de petits seaux (spécifiques de chaque gîte), les stades pré-imaginaux collectés ont été acheminés à un insectarium provisoirement aménagé dans les locaux du laboratoire d'entomologie médicale de l'IRD où ils ont été élevés jusqu'à émergence.

II.2.2 Elevage des larves

II.2.2.1 Répartition des larves et alimentation

Durant toute la durée de l'élevage, un lot de bacs plastiques (33 x 22,5) et de pipettes a été affecté à chaque gîte larvaire. A l'insectarium un effectif de 600 à 1200 larves de même stade a été maintenu dans chaque bac (rempli à moitié par l'eau du gîte) (Boudin et *al.*, 1989). Les larves étaient nourries avec un aliment à base de farine pour alevins, commercialisé sous le nom de *Tetra Min Baby*®. Cette formule en poudre, riche en protéines et en levures naturelles, constitue une nourriture complète pour alevins de poissons tropicaux de moins d'un centimètre et convient parfaitement à une croissance larvaire optimale. La quantité de poudre à verser dans un plateau est corrélée au stade larvaire. Les larves de stade I ont ainsi reçu une quantité médiocre de farine, alors que 300 et 450 mg de poudre ont été versés dans les bacs contenant respectivement des larves de stades II et III (ou IV) (Boudin et *al.*, 1989 ; Diop et *al.*, 1998).

L'eau des bacs a été remplacée tous les 2 à 3 jours par celle du gîte ou du robinet (préalablement décantée).

II.2.2.2 Recueil des nymphes

Les nymphes ont été quotidiennement triées à la pipette et déposées dans des cristallisoirs à moitié remplis d'eau, entre 8h et 10h (Diop et *al.*, 1998). Les nymphes de chaque gîte ont été transférées dans une cage d'émergence cubique (de 17,5 cm d'arête) recouverte d'un tulle moustiquaire dont l'une des faces présentait une ouverture circulaire contiguë à un manchon permettant d'effectuer diverses manipulations. La date suivant immédiatement celle du recueil des nymphes a été marquée sur les cages comme date d'émergence, sachant que pour *An. gambiae s.l.*, cette dernière a lieu 12 à 24 heures après le stade nymphal (Boudin et *al.*, 1989). Les nymphes n'ayant pas émergé ont été récupérées et rajoutées à celles qui venaient d'être recueillies.

II.2.3 Elevage des moustiques adultes

Les adultes exigent une température de 25°C-28 °C et une humidité relative allant de 70% à 80 %. Les cages sont recouvertes de serpillières mouillées qui apportent ainsi l'humidité requise. Du coton imbibé d'un tampon sucré 10% déposé sur les cages permet aux moustiques de s'alimenter. Pour éviter toute fermentation, le coton est changé tous les 2 jours.

Une estimation quotidienne du nombre de moustiques de chaque localité a été faite, en tenant compte de leur âge pour un chronogramme raisonné des bio-essais à effectuer sur les adultes obtenus.

II. 3 Tests de bio-essais en bouteille CDC

II. 3. 1 Bouteilles utilisées

Nous avons utilisé des bouteilles en verre de type Wheaton de 250 ml, selon la méthode décrite par Brogdon & McAllister (1998).

II. 3. 2 Lavage et séchage des bouteilles

Ces bouteilles ont été au préalable soigneusement lavées au savon liquide et rincées à l'eau de robinet, puis à l'eau distillée. Après lavage, elles ont été séchées à l'étuve, à une température de 50°C-60 °C, pendant 30 à 60 minutes. Leurs capuchons (en plastique) ont été également lavés de la même manière, mais leur séchage dans l'étuve exigeait une température plus basse (45°C). La méthode de lavage utilisée est détaillée à l'annexe 3.

II. 3. 3 Insecticides testés

Des molécules appartenant aux quatre familles (Pyréthroïdes, Organochlorés, Organophosphorés et Carbamates) ont été utilisées. Ces produits nous ont été fournis par le Centers for Disease Control (CDC) qui, en même temps, a défini la dose et le temps diagnostiques pour chaque insecticide (annexe 1). Les insecticides étaient déjà formulés en solutions pures hyper concentrées (100X). Des dilutions ont été faites dans de l'acétone pure (> 99 %, Sigma Aldrich) pour obtenir la dose diagnostique de chaque insecticide.

Par ailleurs, des solutions stocks (ou solutions mères) à la dose diagnostique de chaque molécule et dont 1ml est à utiliser pour l'imprégnation d'une bouteille ont été préparées. Les procédures de préparation des solutions d'insecticide sont disponibles sur le site du CDC (<http://www.cdc.gov/malaria>). Les quantités nécessaires d'insecticide (à leur dose diagnostique) à dissoudre dans différents volumes d'acétone pure sont rapportées en annexe 2.

II. 3.4 Imprégnation et conservation des bouteilles

Les bouteilles ont été imprégnées selon la méthode décrite par Brogdon & McAllister (1998), légèrement modifiée (annexe 4). Un millilitre (1 ml) de solution d'insecticide diluée à la dose diagnostique a servi à l'imprégnation de toutes les surfaces internes de chaque bouteille

Après imprégnation, les bouteilles ont été mises à sécher (disparition complète des traces de liquide) puis immédiatement utilisées ou conservés (avec leurs capuchons) dans un placard à l'abri de la lumière, pour les bio-essais ultérieurs (Figure 10). Le temps de conservation avant utilisation des bouteilles imprégnées peut varier de 12 heures à 5 jours de stockage.

Les bouteilles imprégnées peuvent faire l'objet de plusieurs tests (trois au minimum) espacés de 2 à 4 heures.



Figure 10 : Stockage de bouteilles imprégnées d'insecticide

II. 3.5 Exposition des moustiques et détermination des taux de mortalité

Les adultes d'*An. gambiae s.l.* utilisés pour les bio-essais étaient à jeun et âgés de 3 à 4 jours (Brogdon & McAllister, 1998).

Les moustiques à tester (issus de la même population) ont d'abord été mis en observation dans des cages d'émergence, quelques minutes avant leur aspiration dans des tubes à bouche.

Ensuite, des échantillons de 80 à 125 moustiques répartis dans 5 aspirateurs, à raison de 20 à 25 moustiques/aspirateur, sont maintenus en observation pendant 3 à 5 minutes dans les tubes d'aspirateur. Enfin, ces échantillons de moustiques ont été délicatement introduits dans 5 bouteilles, 4 imprégnées et une témoin (Figure 11a) et exposés aux insecticides pendant 120 minutes. La mortalité a été immédiatement relevée. Par la suite, elle a été déterminée toutes les 15 minutes pendant la première heure d'exposition, c'est-à-dire, aux intervalles de temps 0 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 75 ; 90 ; 105 ; 120 minutes.

L'enregistrement de la mortalité a été effectué en considérant les critères décrits par Brogdon & McAllister (1998) : les moustiques ne pouvant se tenir sur pattes ou s'envoler, quand la bouteille est légèrement secouée, sont comptés « morts », ainsi que ceux immobiles ou glissant le long de la courbure de la bouteille roulée horizontalement (Figure 11b).

Les différentes étapes du protocole des bio-essais avec la bouteille CDC sont détaillées en annexe 5.



Figure 11a : Exposition des moustiques



Figure 11b : Lecture de la mortalité

Figure 11 : Bio-essai avec la bouteille CDC en cours

II.3.6 Interprétation des données

L'interprétation des données de mortalité pour la détermination du statut de la population exposée a été faite selon les critères de l'OMS:

- ❖ 98 à 100 % de mortalité au temps diagnostique : population sensible ;
- ❖ 80 à 97 % de mortalité au temps diagnostique : résistance suspectée (confirmation nécessaire par analyses complémentaires);
- ❖ < 80 % de mortalité au temps diagnostique : résistance.

Les résultats ont été validés par ceux obtenus avec la bouteille témoin. La mortalité dans la bouteille témoin ayant été toujours < 3%, il n'a pas été effectué de correction par la formule d'Abbott.

Les données des bio-essais ont été saisies sur des fiches d'enregistrement dont un exemplaire est présenté en annexe 7.

II.4 Mécanismes de résistance

II.4.1 Utilisation de synergistes

Les populations d'*An. gambiae s.l.* résistantes à un insecticide ont été soumises à des bio-essais complémentaires au cours desquels, elles ont d'abord été exposées à des bouteilles traitées avec des synergistes, avant d'être mises à nouveau en contact avec l'insecticide.

Dans un premier temps, deux lots de 80 à 125 moustiques (de la même population) chacun ont été constitués dans des cages d'émergence. Ensuite, les moustiques d'un lot ont été exposés à l'acétone et ceux de l'autre au synergiste, pendant 1 h, avant d'être tous transférés dans les bouteilles imprégnées d'insecticide (annexe 6).

Les données de mortalité obtenues après exposition préalable aux synergistes ont été comparées à celles obtenues directement avec l'insecticide sur la même population d'*An. gambiae s.l.*

Deux synergistes ont été utilisés pour inhiber l'activité enzymatique : le pipéronyl butoxide (PBO, 400 µg/bouteille) et l'acide éthacrynique (EA, 80 µg/bouteille), qui bloquent les mono oxygénases à cytochrome P450 et les glutathion-S-transférases, respectivement.

II. 4. 2 Prévalence du gène *Kdr*

La présence du gène *kdr* responsable de la résistance croisée DDT-Pyréthroïdes a été recherchée chez *An. gambiae s.l.* selon la méthode PCR de Huynh et *al.*, (2007) (annexes 10 et 11) qui utilise des amorces IMPs (Tableau 2), conformément au modèle de Wilkins et *al.*, (2006). La recherche du gène *kdr* ainsi que l'identification spécifique par PCR (*cf* Identification des espèces du complexe *An. gambiae*) a porté sur les mêmes échantillons. La souche de référence *Kisumu*, indemne de toute mutation *kdr*, a servi de témoin négatif.

Tableau 2 : Séquences des amorces IMPs (*Kdr*)

<i>Amorces</i>	<i>Séquences des amorces</i>
IMPs	F : [CTAACGCGAATTAATGCTTTGTGACAG]
	R : [CAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAGC]
WT	[GGTCCATGTTAATTTGCATTACTTACGA a TA]
East / West	[CTTGGCCACTGTAGTGATAGGAAA a TC] /
	[CTTGGCCACTGTAGTGATAGGAAAT g TT]

Les lettres en minuscule indiquent les nucléotides délibérément insérés dans les séquences (mésappariement), tandis que celles en gras désignent les nucléotides situés au niveau des sites SNP; F et R indiquent l'orientation sens et anti-sens des brins

II. 4 Identification par PCR des espèces du complexe

A la fin des bio-essais, les survivants de la bouteille « témoin » ont été assommés au froid (-80 °C) et, au même titre que les spécimens morts, ils ont ensuite été assemblés par lots de 10 dans des tubes Eppendorf (sur lesquels ont été inscrits l'origine des populations d'*An. gambiae s.l.* et le type d'insecticide testé) soigneusement classés dans des boîtes de rangement, avant d'être stockés au réfrigérateur (-20 °C) pour l'identification moléculaire des espèces et la recherche du gène *kdr*.

L'extraction d'ADN a été faite au CTAB 2 %, sur moustique entier, selon le protocole présenté en annexe 8. Les ADNs purs ainsi que ceux dilués ont été mis dans des tubes comportant toutes les indications correspondant aux moustiques à tester (insecticide, mort/vivant, localité). Les tubes ont été placés dans des boîtes de rangement et conservés au réfrigérateur à -20 °C.

Pour l'identification des espèces, l'amplification par PCR de la séquence cible de l'ADN extrait a été effectuée selon la méthode de Wilkins et *al.*, (2006) (annexe 9).

Dans une cuve conductrice de courant et recevant le portoir, les amplicons mélangés avec du bleu de charge ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 2 % (préparé en coulant à chaud dans un portoir un mélange constitué de poudre d'agarose, de tampon TAE 1X et de Biotium) et soumis à migration pendant 35 minutes sous une tension de 100 volts.

Un marqueur de taille déposé dans un ou deux puits du gel (aux extrémités) a servi d'échelle de lecture de la taille des bandes après migration. Cependant, la souche d'*An. gambiae* de l'insectarium, dont les bandes migrent à 463 paires de bases, a souvent été insérée pour pallier la non apparition du marqueur de taille dans les photos de gel.

Un trans illuminateur de type Bio-Rad relié à l'ordinateur (piloté par un logiciel : Quantity one[®]) permettait de visualiser les bandes fluorescentes et d'optimiser les résultats, à la fin de la migration.

II. 6 Analyse des données

L'analyse des données a été effectuée par un logiciel statistique, R *version 3.0.1* (**R core Team., 2013**) qui nous a permis de tracer les graphiques et de comparer les taux de mortalité entre les différents insecticides, selon les différentes localités d'étude.

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1 Résultats globaux

Entre Septembre et Novembre 2012, le statut des populations d'*An. gambiae s.l.* vis-à-vis de huit insecticides (Bendiocarb, Alpha-cyperméthrine, Deltaméthrine, Lambdacyhalothrine, Permethrine, DDT, Féntrothion, Malathion) a été déterminé dans 5 localités (Colobane, Camberène, Guédiawaye, Fass et Mariste) de la région de Dakar (Tableau 3). Les tests de bio-essais avec la bouteille du CDC ont porté sur un total de 2815 spécimens adultes d'*An. gambiae s.l.*

Tableau 3 : Taille de l'échantillon de moustiques testés selon la molécule insecticide et la localité.

Molécules	Localités				
	Colobane	Camberène	Guédiawaye	Fass	Mariste
Bendiocarb	112	92	97	104	105
DDT	161		96	94	126
Deltaméthrine	90	144		119	109
Permethrine	167		115	118	
Lambdacyhalothrine	150			99	
Alphacyperméthrine	158				
Féntrothion	167				
Malathion				104	
Permethrine-PBO			120		
DDT-EA	91			77	
Taille échantillon par localité	1096	236	428	715	340
Total de moustiques testés	2815				

III.2 Sensibilité d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes et au DDT

III.2.1 Pyréthrinoïdes

- Deltaméthrine

Les taux de mortalité post exposition à la deltaméthrine ont été de 89,92 % (n=119), 97,25 % (n=109), 93,79 % (n=144) et 94,44% (n=90) respectivement à Fass, à Mariste, à Camberène et à Colobane (Figure 12). Ces résultats indiquent une suspicion de résistance d'*An. gambiae s.l.* à la deltaméthrine dans ces localités.

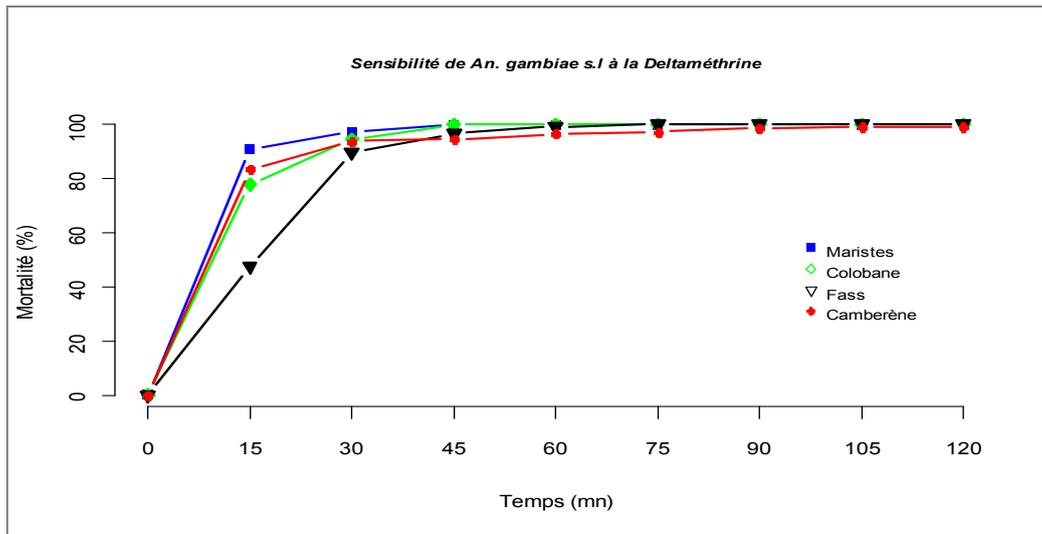


Figure 12 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Mariste, Colobane, Fass, Camberène) après 2h d'exposition à la Deltaméthrine (12,5 µg/bouteille)

- **Perméthrine**

Pour la perméthrine, les taux de mortalité après exposition des échantillons ont été de 94,91 % (n=118) à Fass, 40 % (n=115) à Guédiawaye et 98,80 % (n=167) à Colobane, indiquant ainsi une situation très hétérogène pour cet insecticide, avec une population sensible à Colobane, suspectée de résistance à Fass et fortement résistante à Guédiawaye (Figure 13)

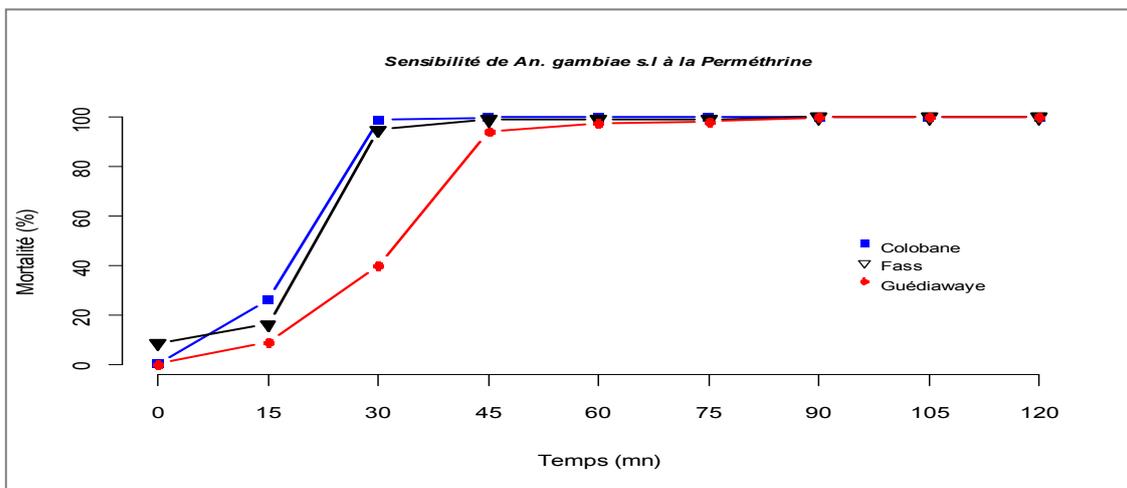


Figure 13 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Colobane, Fass, Guédiawaye) après 2h d'exposition à la Perméthrine (21,5 µg/bouteille)

- **Lambdacyhalothrine**

La lambdacyhalothrine n'a été testée que dans les localités de Colobane (n=150) et de Fass (n=99) où la mortalité des échantillons a été totale. (Figure 14).

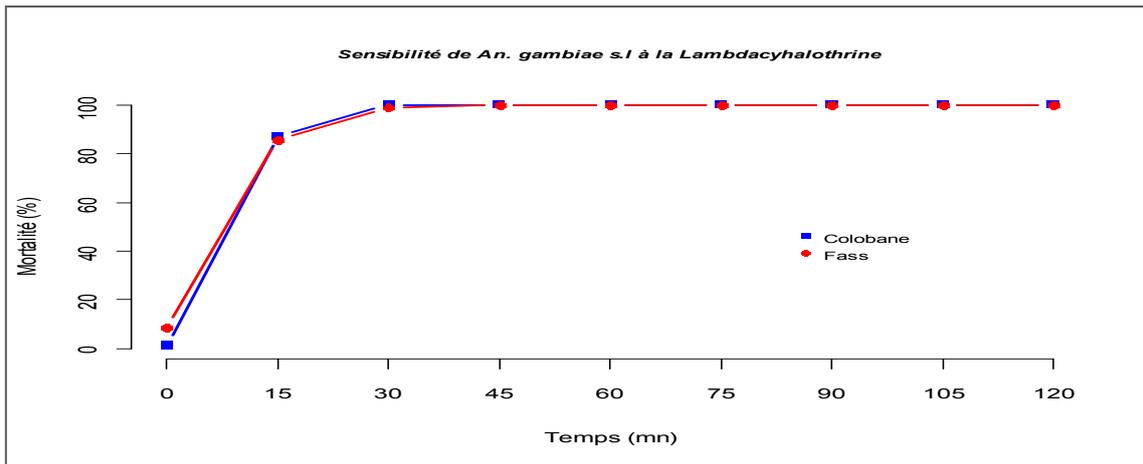


Figure 14 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Colobane, Fass) après 2h d'exposition à la Lambdacyhalothrine (12,5 µg/bouteille)

- **Alpha-cyperméthrine**

L'alpha-cyperméthrine n'a été testée qu'à Colobane où la mortalité de l'échantillon testé a été totale (Figure 15)

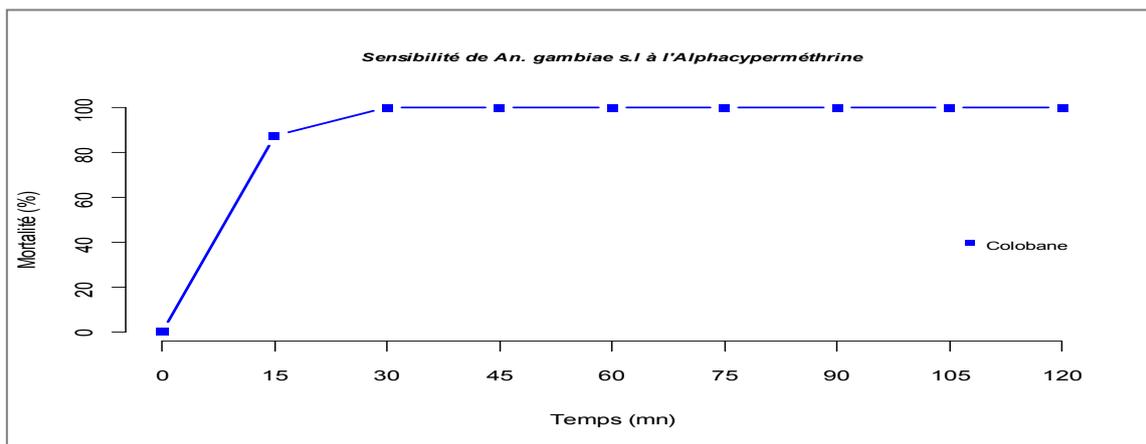


Figure 15 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Colobane) après 2h d'exposition à l'Alpha-cyperméthrine (12,5 µg/bouteille)

III. 2. 2 DDT

Pour le DDT, les taux de mortalité ont été de 80,95 % (n=126), 17,39 % (n=161), 27,66 % (n=94) et 67,01 % (n=96) respectivement dans les localités de Mariste, Colobane, Fass et Guédiawaye, indiquant partout une forte résistance d'*An. gambiae s.l.* à cet organochloré (Figure 16).

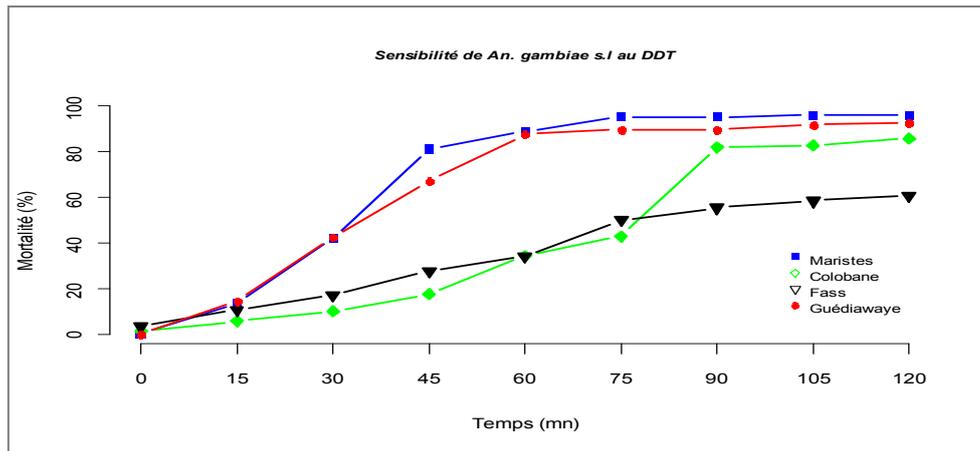


Figure 16 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Maristes, Colobane, Fass, Guédiawaye) après 2h d'exposition au DDT (100 µg/bouteille)

III. 3 Sensibilité d'*An. gambiae s.l.* aux Carbamates et aux Organophosphorés

III. 3.1 Carbamates

Une mortalité de 100 % a été notée dans les zones de Maristes (n=105), Colobane (n=112), Fass (n=104) et Camberène (n=92) pour le bendiocarb. *An. gambiae s.l.* est encore sensible à ce carbamate dans ces localités. Par contre, à Guédiawaye (n=97), les résultats obtenus montrent 42,27 % de mortalité, indiquant une forte résistance d'*An. gambiae s.l.* au bendiocarb dans cette dernière zone (Figure 17).

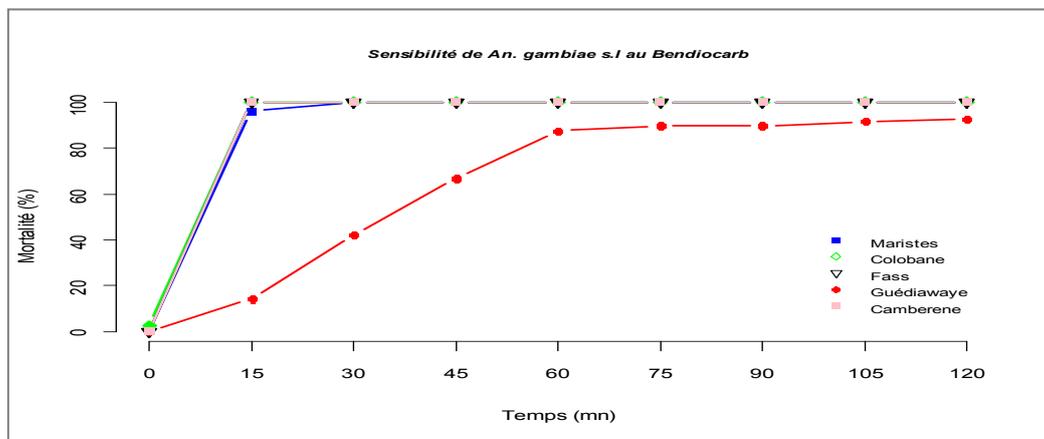


Figure 17: Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Maristes, Colobane, Fass, Guédiawaye, Camberène) après 2h d'exposition au Bendiocarb (12,5 µg/bouteille)

III. 3.2 Organophosphorés

Les tests effectués sur les populations d'*An. gambiae s.l.* de Colobane et Fass ont permis d'enregistrer 100 % de mortalité pour le fénitrothion (n=167) et 99,04 % pour le malathion (n=104). Ces résultats indiquent qu'*An. gambiae s.l.* est encore susceptible aux organophosphorés dans ces localités (Figures 18, 19).

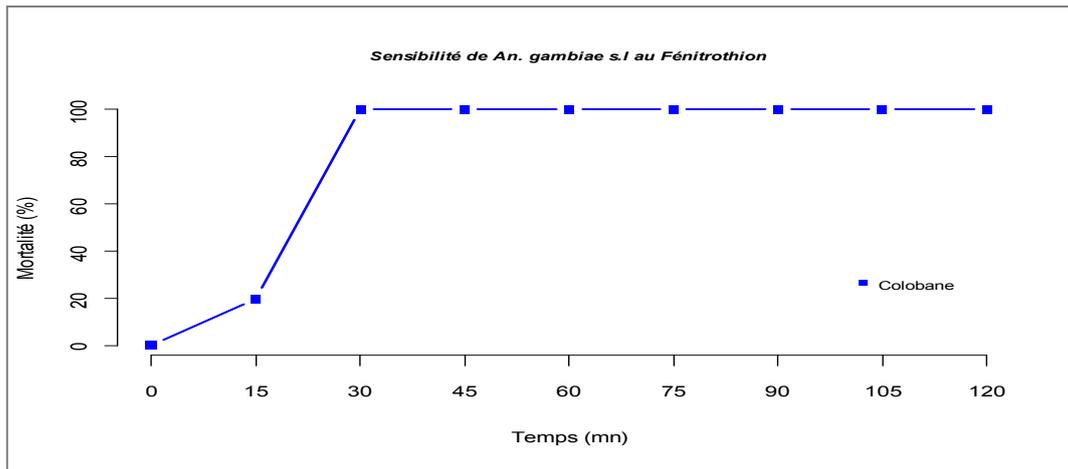


Figure 18 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Colobane) après 2h d'exposition au Fénitrothion (50 µg/bouteille)

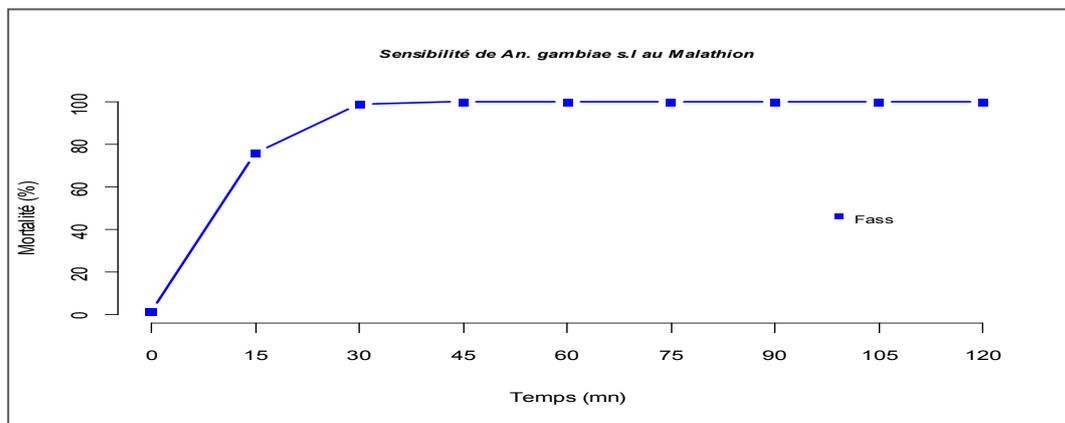


Figure 19 : Mortalité chez *An. gambiae s.l.* (Fass) après 2h d'exposition au Malathion (50 µg/bouteille)

III.4 Bio-essais avec synergistes

III.4.1 Pipéronyl butoxide (PBO)

Une pré-exposition d'une heure au pipéronyle butoxide (PBO, 400 µg/bouteille) a permis d'observer une mortalité de 100 % (n=120) pour la perméthrine à Guédiawaye où l'exposition directe indiquait une relative tolérance d'*An. gambiae s.l.* à cet insecticide (avec 96,67 % de spécimens sur 138 exposés). Cela démontre l'implication des mono oxygénases à cytochrome P450 dans les processus de détoxification puisque l'activité insecticide de la perméthrine a été nettement améliorée après l'inhibition de ces oxydases (Figure 20). Toutefois, un test de Student apparié effectué n'a pas permis d'observer des différences nettement significatives dans l'évolution globale de cette mortalité aux intervalles de temps 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 et 120 minutes (P=0,3).

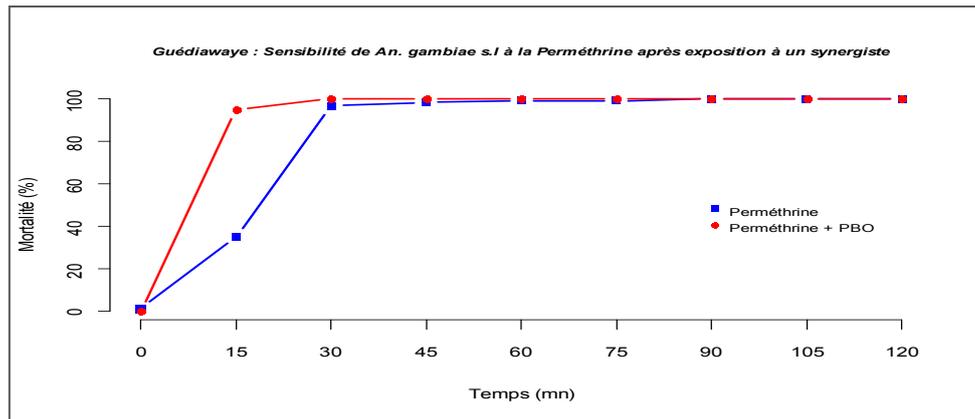


Figure 20 : Taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* suite à l'exposition directe à la perméthrine et à une pré-exposition au PBO (Guédiawaye)

III. 4.2 Acide éthacrynique (EA)

Après une heure d'exposition à l'acide éthacrynique (EA, 80 µg/bouteille), les taux de mortalité face au DDT sont passés de 27,66 % (n=94) à 85,71 % (n=77) à Fass, et de 11,67 % (n=60) à 23,08 % (n=91) à Colobane (Figures 21, 22). Un test de Student apparié a permis de montrer que l'activité insecticide du DDT a augmenté de manière significative dans les localités de Fass (P=0,034) et de Colobane (P=0,003). L'implication des Glutathion-S-transférases dans la résistance d'*An. gambiae s.l.* au DDT après pré-exposition à l'EA est ainsi démontrée.

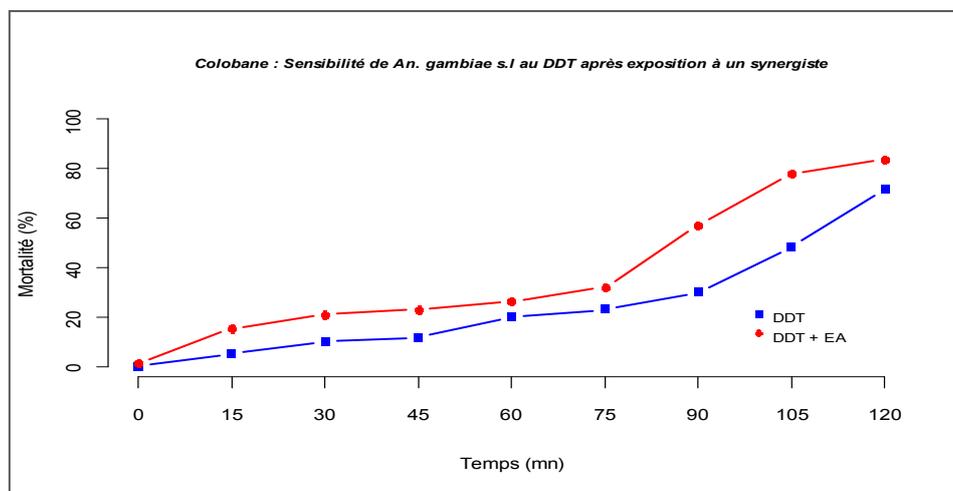


Figure 21 : Taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* suite à l'exposition directe au DDT et à une pré-exposition à l'acide éthacrynique (Colobane)

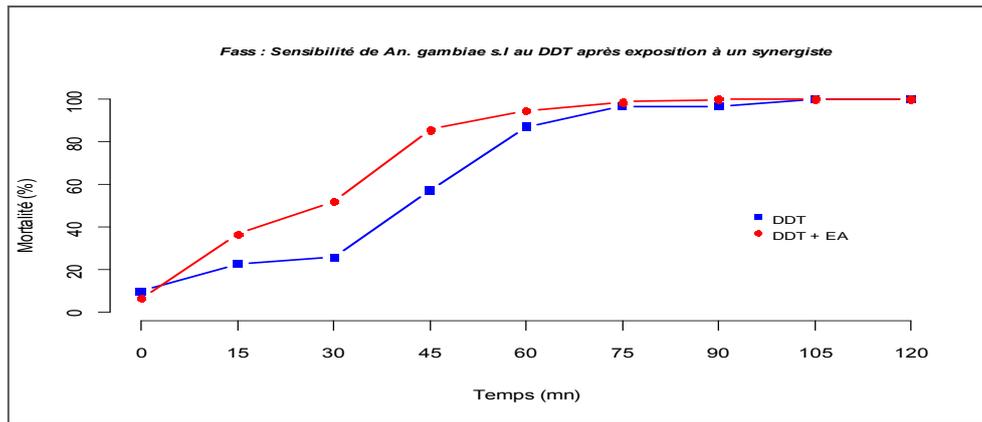


Figure 22 : Taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* suite à l'exposition directe au DDT et à une pré-exposition à l'acide éthacrynique (Fass)

III.5 Identification spécifique et prévalence du gène Kdr

III.5.1 III.3 Identification des membres du complexe *An. gambiae*

L'identification par PCR des espèces du complexe *An. gambiae s.l.* a révélé la présence exclusive d'*An. arabiensis* dans les localités étudiées (tableau 4). Cependant, quelques spécimens n'ont pu être identifiés par défaut d'apparition des bandes dans le gel.

Tableau 4 : Distribution des espèces d'*An. gambiae s.l.* dans 5 localités de Dakar

Localités	<i>An. gambiae s.s.</i>	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. melas</i>	Non interprétés
Camberène	0	15	0	4
Colobane	0	23	0	0
Fass	0	42	0	5
Guédiawaye	0	20	0	3
Maristes	0	22	0	2
Total	0	122	0	14

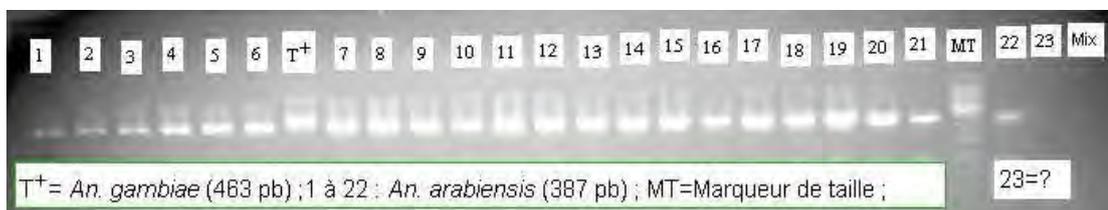


Figure 23 : Photo de gel montrant le résultat de l'identification par PCR des espèces d'*An. gambiae s.l.*

III. 5. 2 Prévalence du gène *Kdr*

Aucune des PCR diagnostiques effectuées chez les populations d'*An. arabiensis* n'a indiqué la présence du gène *Kdr* dans les sites prospectés (tableaux 5 et 6).

Tableau 5 : Recherche du gène *kdr West* chez *An. arabiensis* dans 5 localités de Dakar

Localités	Testés	RR	RS	SS	F(KdrWest)
Camberène	23	0	0	23	0,0000
Colobane	23	0	0	23	0,0000
Fass	46	0	0	46	0,0000
Guédiawaye	23	0	0	23	0,0000
Maristes	21	0	0	21	0,0000

Tableau 6 : Recherche du gène *kdr East* chez *An. arabiensis* dans 2 localités de Dakar

Localités	Testés (<i>arabiensis</i>)	RR	RS	SS	F (Kdr East)
Colobane	22	0	0	22	0,0000
Maristes	21	0	0	21	0,0000

III.6 Discussion

An. arabiensis constitue la seule espèce du complexe *An. gambiae* rencontrée dans nos sites d'étude. Cela corrobore davantage les données d'études entomologiques réalisées dans la région de Dakar, notamment à Pikine (Verduyck & Janclou, 1981 ; Trape et al., 1992, Gadiaga et al., 2011), dans les Niayes (Faye et al., 1995a, 1995b), au niveau des districts sanitaires Sud (Plateau, Médina, Gueule-Tapée, Fann Hock, Fann résidence, Bel-Air, Fass, Colobane) et Centre (Zone B, Liberté I, Liberté VI, HLM III, Derklé-Castors, Cité des eaux, Niari Talli, Bop-Cerf-Volant, Zone industrielle) (Diallo et al., 1998, 2000), à Ouakam (Pagès et al., 2008), à Thiaroye et à Guédiawaye (Gadiaga et al., 2011). Dakar affiche donc le même « visage entomologique » depuis bien des décennies, avec une composition de la faune anophélienne caractérisée par la présence exclusive d'*An. arabiensis*.

Les populations d'*An arabiensis* se comportent différemment vis-à-vis des insecticides à travers les cinq zones d'étude (Colobane, Fass, Guédiawaye, Camberène et Mariste).

Les résultats des bio-essais avec la bouteille CDC montrent que les populations d'*An arabiensis* de Guédiawaye sont résistantes au bendiocarb (42,27 % de mortalité sur 97 testés) et sensibles aux organophosphorés (mortalité totale). Les résultats sur le bendiocarb pourraient être liés à une importante utilisation de ce carbamate (pression de sélection), dans la lutte contre les vecteurs de maladies, comme il a été rapporté dans la plupart des pays africains et où l'emploi d'organophosphorés est très négligeable (OMS, 2011a).

Pour les pyréthrinoïdes, la situation est surtout marquée par une forte résistance à la perméthrine, notamment à Guédiawaye (40 % de mortalité sur 115 spécimens testés), et une certaine tolérance à la deltaméthrine. Une situation comparable a été obtenue en Ouganda orientale (Jinja) où *An. arabiensis* s'était montré résistant à la perméthrine et assez tolérant à

la deltaméthrine (Mawejje et al., 2012). Par contre, en faisant le point sur la situation de la résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique, Chandre et al., (1999) avaient plutôt indiqué que les populations d'*An. arabiensis* de Dakar étaient sensibles à la perméthrine. Pour l'alpha-cyperméthrine et la lambda-cyhalothrine, nous avons obtenu une mortalité totale.

Par ailleurs, les populations d'*An. arabiensis* (Colobane, Fass, Mariste, Guédiawaye) présentent partout une forte résistance au DDT.

Les résultats que nous avons obtenus avec la perméthrine et le DDT pourraient être attribués à une pression de sélection exercée contre les populations d'*An arabiensis*, par l'utilisation intensive de pesticides, notamment dans les zones de maraîchage ou même au niveau des ménages. Diallo et al. (2000) ont montré qu'en milieu urbain, 77,5 % des ménages mettent en place un certain nombre de mesures (emploi de moustiquaires, de répulsifs anti moustiques, d'insecticides) pour se prémunir contre les piqûres de moustiques. A Guédiawaye, où une bonne partie des habitants s'adonnent à des activités maraîchères et horticoles, des analyses biochimiques complémentaires menées sur un échantillon de la population d'*An arabiensis*, par recours à un synergiste (PBO, 400 µg/bouteille), ont permis de ramener la mortalité à 100 % (contre 96,67 %) au temps diagnostique. De même, chez les populations respectives d'*An. arabiensis* de Fass et de Colobane qui montrent une forte résistance au DDT, la mortalité a été nettement améliorée (27,66 % à 85,71 % et 11,67 % à 23,08 %, respectivement), après une pré-exposition au synergiste EA (80 µg/bouteille). Or, d'après nos résultats sur la recherche du gène *kdr*, il n'a pas été mentionné la présence de ce gène dans aucune des zones étudiées. Ces résultats sont différents de ceux enregistrés à Dakar par Pagès et al. (2008) à Bel Air et Ouakam et par Niang (2009) dans une zone rurale des Niayes (Deggu Niay). Nos résultats sont conformes à ceux de certaines études qui ont également souligné l'absence de la mutation *kdr* chez *An. arabiensis*, notamment en Afrique de l'Ouest (Chandre et al., 1999), à Madagascar (Ratovonjato et al., 2003) et au Kenya occidental (Ochomo et al., 2013). Les cas rares où le gène *Kdr* L1014F (*Kdr West*) a été mis en évidence chez des populations d'*An. arabiensis* du Soudan (Sennar et Gezira), n'ont pas permis d'établir la corrélation entre la présence de ce gène et les phénotypes résistants (Matambo et al., 2007; Abdalla et al., 2008). Récemment, l'allèle *kdr* L1014S (*kdr East*) a été détecté chez *An. arabiensis* en Ouganda orientale (Jinja), mais à une fréquence très faible (0,07 %) (Mawajje et al., 2012).

En intégrant les données de mortalité, les résultats obtenus avec les synergistes et l'absence du gène *Kdr*, nous pouvons élucider la nature biochimique de la résistance observée, en soulignant fortement l'implication des oxydases (mono oxygénases à cytochrome P450) et des estérases (GST). Toutefois, l'évaluation de l'activité de ces enzymes (mesure de l'absorbance) n'a pas été effectuée chez les individus résistants. Cela aurait permis d'établir de bonnes corrélations, sachant que la bouteille CDC mesure directement la réponse toxicologique d'un insecte soumis à une dose donnée d'insecticide (Brogdon & McAllister, 1998).

Conclusion

La bouteille CDC constitue un outil très accessible de surveillance de la résistance des vecteurs et présente un certain nombre d'avantages ; elle permet d'obtenir rapidement des résultats, d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance et d'élargir la gamme d'insecticides utilisables par le personnel de terrain (Brogdon & McAllister, 1998). Elle a été utilisée dans plusieurs études qui ont démontré son efficacité. Par exemple, dans le bassin amazonien (Perea et al., 2009) et au sud du Bénin (Aïzoun et al., 2013), des études comparatives entre la bouteille CDC et le kit OMS ont donné des résultats similaires, respectivement sur des échantillons de populations d'*An. albimanus* et d'*An. gambiae s.s.*, toutes résistantes à la deltaméthrine. Une étude réalisée au Kenya (Ochomo et al., 2013) a montré que la bouteille CDC pouvait compléter les résultats du Kit OMS en mesurant le temps de knock-down (KTD₅₀) qui constitue un indicateur avéré de la résistance (Chandre et al., 1999), et ces résultats ont été complétés par la mesure de l'activité enzymatique avec des bio-essais utilisant des microplates.

Au Sénégal, aucune étude associant la bouteille CDC pour la détection de la résistance n'a été faite. Cette étude effectuée avec la bouteille CDC dans quelques centres urbains de Dakar a permis de réactualiser les données sur *An. arabiensis* et d'évaluer son statut de résistance. La résistance des vecteurs aux insecticides est devenue un lourd fardeau pour les programmes de lutte anti vectorielle. Au niveau national, une étude entomologique sur la situation de la résistance des vecteurs à grande échelle, associant bouteille CDC, kit OMS, synergistes et microplates, devrait être réalisée. Cela permettrait de mieux caractériser cette résistance, notamment dans les zones endémiques, mais également de faire une bonne évaluation des AID et des MILDA ainsi que leur impact sur le comportement des vecteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdalla H., Matambo T.S., Koekemoer L.L., Hunt R.H. & Coetzee M. 2008.** Insecticide susceptibility and vector status of natural populations of *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102** : 263-271
- Aïzoun N., Ossè R., Azondekon R., Alia R., Oussou O., Gnanguenon V., Aikpon R., Padonou G.G, Akogbéto M. 2013.** Comparison of the standard WHO susceptibility tests and the CDC bottle bioassay for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors and their correlation with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors*. **6:147**
- Alemu A., Tsegaye W., Golassa L., Abede G. 2011.** Urban malaria and associated risk factors in Jimma town, south-west Ethiopia. *Malar J.* **10:173**
- Alignon D., Bonneau J., Garcia J., Gomez D. & Le Goff D. 2010.** Estimation des expositions générales aux insecticides : les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthrinoides. Projet d'Estimation des risques sanitaires. IGS Persan/EHESP
- Badolo A, Traoré A, Jones C.M., Sanou A et al. 2012.** Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malaria Journal*. **11:232**
- Bloomquist J. R. 1996.** Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol.* **41: 163-90**
- Boudin C., Lyannaz J., Bosseno M.F., Chaize J. & Carnavale P. 1989.** Production de sporozoïtes de plasmodiums humains à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Ann. Soc. belge Méd. Trop.* **63 :3-23**
- Brogdon W.G, McCallister J.C. 1998.** Simplification of Adult Mosquito Bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **14(2):159-164.**
- Bryskier A. & Labro M.T. 1988.** Paludisme et médicaments. *Editions ARNETTE*, Paris
- Carlson D.A & Service M.W. 1980.** Identification of mosquitoes of *Anopheles gambiae* species complex A and B by analysis of cuticular components. *Science*, **207:1089-1091.**
- Carlson J., Keating J., Mbogo C.M., Kahindi S., Beier J.C. 2004.** Ecological limitations on aquatic mosquito predator colonization in the urban environment. *J Vector Ecol.* **29:331-339**
- Carnevale P. & Robert V. 2009.** Les anophèles : biologie, transmission du paludisme et lutte anti vectorielle. IRD Editions. *Collection Actiques*, Marseille. 402p
- Chandre F., Manguin S., Brengues C., Dossou Y.J. et al. 1999.** Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia.* **41 (1-3):319-22.**

- Coetzee M., Hunt R., Wilkerson R. Della Torre A., Coulibaly M.B. & Besansky N.J. 2013.** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619 (3): 246–274
- Collins F.H., Mendez M.A., Rasmussen M.O., Mehaffey P.C., Besansky N.J., Finnerty V. 1987.** A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg*, **37**:37-41.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V & Di Deco M.A. 1979.** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **Vol. 73. No.5**
- Coluzzi M., Petrarca V. & Di Deco M.A. 1985.** Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll. Zool.* **52: 45-63**
- Davidson G.** *Anopheles gambiae*, a complex of species. **1964.** *Bull. Wld Hlth Org.* **31: 625-634**
- della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V. & Coluzzi M. 2001.** Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology.* **10(1):9-18**
- Diagne N., Fontenille D., Konaté L., Faye O. et al. 1994.** Les Anophèles du Sénégal. Liste commentée et illustrée. *Bull. Soc. Path. Ex.* **87 : 267-277**
- Diallo S., Konaté L., Faye O., Ndir O., Faye M., Guèye A. & Diouf M. 1998.** Le paludisme dans le District sanitaire sud de Dakar (Sénégal) : Données entomologiques. *Bull. Soc. Path. Ex.* **91(3) : 259–263.**
- Diallo S., Konate L., Ndir O., Dieng T., Dieng Y., Bah Bella I., Faye O., Gaye O. 2000.** Le paludisme dans le district sanitaire centre de Dakar (Sénégal). Données entomologiques, parasitologiques et cliniques. *Cahiers Santé.* **10(3) : 221-9.**
- Diop A., Faye O., Molez J.F. 1998.** Mise en place en insectarium d'une souche d'*Anopheles arabiensis* (Diptera : Culicidae). *Bull. Soc. Path. Ex.*, 91(4): 340-43
- Diop A., Molez J.F., konaté l., Fontenille D., Gaye O. Diouf M., Diagne M. & Faye O. 2002.** Rôle d'*Anopheles melas* Theobald 1903 dans la transmission du paludisme dans la mangrove du Saloum (Sénégal). *Parasite.* **9 : 239-246**
- Djègbè I., Boussari O., Sidick A., Martin T., Ranson H., Chandre F., Akogbéto M. & Corbel V. 2011.** Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal.* **10:261**
- Donnelly M.J, McCall P.J, Lengeler C., Bates I., D'Alessandro U., Barnish G., Konradsen F., Klinkenberg E, Townson H, Trape J.F, Hastings I.M, Mutero C. 2005.** Malaria and urbanization in sub-Saharan Africa. *Malar J* **4:12**
- Fanello C., Santolamazza F. & della Torre A. 2002.** Simultaneous identification of species and molecular forms of *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol.* **16:461-464.**

- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sidén-Kiamos I. & Louis C. 2001.** Molecular characterisation of ribosomal DNA polymorphisms discrimination among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. **10 (1) : 19-23**
- Faye O.** Le paludisme au Sénégal. Ecologie de la parasitose et perspectives de lutte. **1994.** *Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles*. UCAD/FST-Dakar (Sénégal), n° 05, **296p.**
- Faye O., Gaye O., Fontenille D., Hebrard G., Konaté L. et al. 1995a.** La sécheresse et la baisse du paludisme dans les Niayes du Sénégal. *Cahiers Santé*. **5 : 299-305.**
- Faye O., Gaye O., Fontenille D., Konaté L., Hebrard G. et al. 1995b.** Comparaison de la transmission du paludisme dans deux faciès épidémiologiques au Sénégal : la zone côtière sahélienne et la zone méridionale soudanienne. *Dakar Médical*. **40 : 201-207 .**
- Faye O., Konaté L. et Diop A. 2011.** Profil entomologique du paludisme au Sénégal. PNL P.
- Gadiaga L., Machault V., Pagès F., Gaye A. et al. 2011.** Conditions of malaria transmission in Dakar from 2007 to 2010. *Malaria Journal*. **10:312**
- Harbach R.E. 1994.** Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera : Culicidae) : the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull. Ent. Res.* **84 : 331-342.**
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L. & Ranson H. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **34 : 653-665**
- Hunt R.H., Coetzee M. & Fettene M.,** The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. **1998.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **92: 231-235**
- Huynh LY, Sandve SR, Hannan LM, Van Ert M, Gimnig JE. 2007.** Fitness costs of pyrethroid insecticide resistance in *Anopheles gambiae*. *In: Annual Meeting of the Society for the Study of Evolution, Christchurch, New Zealand.*
- Kerah-Hinzoumbé C., Péka M, Nwane P, Donan-Gouni I, Etang J., Samè-Ekobo A. & Simard F. 2008.** Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from south-western Chad, Central Africa. *Malaria Journal*. **7:192**
- Knight K.L., Stone A. 1977.** A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera : Culicidae). *Washington, Thomas Say Foundation, Volume VI. 611p.*
- Mahon R.J, Green C.A & Hunt R.H. 1976.** Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bull Entomol Res*, **66:25-31.**
- Matambo T.S., Abdalla H., Brooke B.D., Koekemoer L.L., Mnzava A., Hunt R.H. and Coetzee. M. 2007.** Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the *kdr* mutation. *Medical and Veterinary Entomology*. **21 : 97–102**

- Mawejje H.D., Wilding C.S., Rippon E.J., Hughes A., Weetman D. and Donnelly M.J. 2012.** Insecticide resistance monitoring of field-collected *Anopheles gambiae s.l.* populations from Jinja, eastern Uganda, identifies high levels of pyrethroid resistance. *Medical and Veterinary Entomology* doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01055.x
- Mayr E. 1942.** Systematics and the origin of species. University press ed. Columbia.
- McLain D.K., Collins F.H., Brandling-Bennett A.D. & Were J.B.O. 1989.** Microgeographic variation in rDNA intergenic spacers of *Anopheles gambiae* in western Kenya. *Heredity*. **62: 257-264**
- Mouchet J., Carnavale P., Coosmans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D. & Sircoulon J. 2004.** Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext.
- Namountougou M. 2007.** Distribution de la fréquence des mutations kdr et ace-1 principaux gènes de résistance aux insecticides dans le complexe d'*An. gambiae* dans l'Ouest du Burkina Faso.. DEA/Université Polytechnique de Bobo (Burkina Faso). **48p**
- Ndiath M.O., Brengues C., Konaté L., Sokhna C., Boudin C., Trape J.F & Fontenille D. 2008.** Dynamics of transmission of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles arabiensis* and the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* in Dielmo, Senegal. *MalarJ*. **7:136**
- Niang E.A. 2009.** Distribution des formes d'*Anopheles gambiae s.s.* et du gène de la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes (kdr) chez les vecteurs du paludisme au Sénégal. DEA Biologie Animale, FST/UCAD. **97p**
- Ochomo E., Bayoh M.N, Brogdon W.G, Gimnig J.E, Ouma C., Vulule J.M., Walker E.D. 2013.** Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae s.s.* and *Anopheles arabiensis* in western Kenya: phenotypic, metabolic and target site characterizations of three populations. *Medical and Veterinary Entomology*. **27:156-164**
- OMS. 1957.** Sér. Rapp. Tech. **125, 8**
- OMS. 1980.** Cinquième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte anti-vectorielle. Sér. Rapp. Tech. **655**
- OMS. 1998.** Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors; bio efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Report of the WHO informal consultation. 46p
- OMS. 2006.** Sér. Rapp. Tech. **936.**
- OMS. 2011.** WHO Report
- OMS. 2011a.** Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10 -year assessment (2000 2009). **5th Ed.** WHO/HTM/NTD/VEM/WHOPES/2011.6
- OMS. 2012.** WHO Report
- OMS. 2013.** Chimio-prévention du paludisme saisonnier par administration de sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine aux enfants. Guide de terrain. 56p.

- Pagès F., Orlandi-Pradines E., Corbel V. 2007.** Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **37(3):153-161**
- Pagès F., Texier G., Pradines B., Gadiaga L. et al. 2008.** Malaria transmission in Dakar: A two-year survey. *Malaria Journal*. **7:178**
- Perea E.Z., León R.B., Salcedo M.P., Brogdon W.G., Devine G.J. 2009.** Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria J*. **8** : 208.
- Peterson H.E. 1963.** The species, species control and antimalarial spraying campaigns. Implications of recent work on the *A. gambiae* complex. *S. Afr. J. med. Sci.* **28: 33**
- R Core Team. 2013.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ranson, H., Abdallah, H., Badolo, A. et al. 2009.** Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlighting the extent of the problem. *Malaria Journal*. **8** : **299**
- Ratovonjato J., Le Goff G., Rajaonarivelo E., Rakotondraibe E.M., Robert V. 2003.** Données récentes sur la sensibilité d'*Anopheles arabiensis* et d'*Anopheles funestus* aux pyrèthriinoïdes et au DDT sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar-Résultats préliminaires montrant une absence de la mutation *kdr* chez *An. arabiensis*. *Arch Inst Pasteur de Madagascar*. **69 (1&2)** : 63-69
- Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle B.M., Rauh J.J., Sattelle D.B. 2005.** Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience*. **5:119-133**
- Rogier C., Henry M.C, Trape J.F. 2009.** Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie. *Med Trop* **69** :123-142
- Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H. 1993.** Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, **49:520-529**.
- Sokhna C., Ndiath M.O. & Rogier C. 2013.** The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. *Clin Microbiol Infect*. **19 (10)** : **902-907**.
- Temu E.A, Maxwell C., Munyekenye G., Howard A.F.V., Munga S., et al. 2012.** Pyrethroid Resistance in *Anopheles gambiae*, in Bomi County, Liberia, Compromises Malaria Vector Control. *PLoS ONE*. **7:9**.
- Trape J.F.** Impact de l'urbanisation sur le paludisme en Afrique centrale. **1986.** *Thèse d'Etat es Sciences Naturelles*. Université de Paris-Sud Centre d'Orsay. **409p**
- Trape J.F, Lefebvre Zante F., Legros F., Ndiaye G., Bouganaly H. et al. 1992.** Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. **47:** 181-189.

- Vercruyse J. & Jancloues M.** Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans la zone urbaine de Pikine (Sénégal). **1981**. *Cahier O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. Et Parasitol.*, Vol XIX, n°3 : 165-178.
- Wang S., Lengeler C., Smith T.A, Vounatsou P., Cisse G., Tanner M.** **2006**. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) III: epidemiology of urban malaria in the municipality of Yopougon (Abidjan). *Malar J.* **5** : 29
- White G.B.** **1973**. Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt., Culicidae). III. The distribution, ecology, behaviour and vectorial importance of species D in Bwamba County, Uganda, with an analysis of biological, ecological, morphological and cytogenetical relationships of Ugandan species D. *Bull. Ent. Res.* **63**: 65-97
- White G.B.** **1974**. Biological effects of intraspecific chromosomal polymorphism in malaria vector populations. *Bull. Wld Hlth Org.* **50**: 299-366
- Wilkins E.E, Howell P.I, Benedict M.Q.** **2006**. IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification, Mopti and Savanna rDNA types, and resistance to dieldrin in *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal.* **5**:125.
- Yadouleton A.W., Padonou G., Asidi A., Moiroux N. et al.** **2010**. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal.* **9**:83
- Yssouf A., Socolovschi C., Flaudrops C., Ndiath M.O., Sougoufara S., et al.** **2013**. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry: An Emerging Tool for the Rapid Identification of Mosquito Vectors. *PLoS ONE.* **8(8)**:e72380. doi:10.1371/journal.pone.0072380
- Zlotkin E.** **1999**. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* **44** : 429–55

Titre : Evaluation de la sensibilité aux insecticides par la technique des tests de bio-essais en bouteille du CDC et détermination des mécanismes de résistance chez *An. gambiae s.l.* dans la ville de Dakar, Sénégal.

Nom du candidat : Omar THIAW

Nature du mémoire : Master en Biologie animale / Spécialité : Entomologie médicale

Soutenu le 16 Avril 2014

Membres du Jury :

Président : Pr Ousmane FAYE (Professeur, UCAD)

Membres : Dr Ibrahima DIA (Chercheur, IPD)

Dr Cheikh-S. SOKHNA (Chercheur, IRD)

Dr Lassana KONATE (Maître de conférences, UCAD)

Résumé

Le statut des populations d'*An. gambiae s.l.* vis-à-vis de huit insecticides a été évalué avec la bouteille CDC, entre septembre et novembre 2012, dans cinq localités de Dakar, zone urbaine soudano-sahélienne.

Les résultats PCR ont indiqué la présence exclusive d'*An. arabiensis*, dont les populations se sont particulièrement montrées résistantes à la perméthrine (pyréthrianoïde), au DDT (organochloré) et au bendiocarb (carbamate). L'implication des mono oxygénases à cytochrome P450 et des GST dans cette résistance (résistance métabolique) a été démontrée par recours à des synergistes spécifiques (PBO, EA), et confortée par l'absence de la mutation *Kdr* chez les différentes populations d'*An. arabiensis* étudiées.

Mis à part les données entomologiques, les résultats des bio-essais CDC ont davantage montré la flexibilité et l'adaptabilité de la bouteille CDC dans la détection de la résistance chez les vecteurs du paludisme.

Mots clés: *An. gambiae s.l.*, *An. arabiensis*, bio-essais en bouteille du CDC, insecticides, résistance, synergistes, *Kdr*, Dakar

Summary

From September to November 2012, the status of *An. gambiae s.l.* populations towards eight insecticides was assessed in five districts in Dakar, a soudano-sahelian area. The PCR results showed that *An. arabiensis* was only the sibling species of the *An. gambiae* complex met in the prospected areas. That species was especially resistant to permethrin, DDT and bendiocarb. Bioassays performed on *An. arabiensis* populations with the use of synergists (PBO, EA) indicated an enzymatic key role of the cytochrome P450-dependent monooxygenases and the glutathion-S-transferases in the metabolic resistance observed. Such a result was reinforced by the absence of the *Kdr* gene among the different studied populations.

In addition to the entomological data, the CDC bottle bioassays allowed to demonstrate once more the flexibility and adaptability of the CDC bottle in the detection of insecticide resistance among malaria vectors.

Key-words: *An. gambiae s.l.*, *An. arabiensis*, CDC bottle bioassays, insecticides, resistance, synergists, *Kdr*, Dakar.

ANNEXES

ANNEXE 1: Doses et temps diagnostiques de différents insecticides pour *An. gambiae s.l.*

(CDC: <http://www.cdc.gov/malaria>)

Insecticides	Doses diagnostiques des insecticides (µg/bouteille)	Temps diagnostiques (minutes)
Bendiocarb	<i>12,5</i>	<i>30</i>
Cyfluthrine	<i>12,5</i>	<i>30</i>
Cyperméthrine (alpha)	<i>12,5</i>	<i>30</i>
DDT	<i>100</i>	<i>45</i>
Deltaméthrine	<i>12,5</i>	<i>30</i>
Fénitrothion	<i>50</i>	<i>30</i>
Lambdacyhalothrine	<i>12,5</i>	<i>30</i>
Malathion	<i>50</i>	<i>30</i>
Perméthrine	<i>21,5</i>	<i>30</i>
Pirimiphos-methyl	<i>20</i>	<i>30</i>

ANNEXE 2: Préparation des solutions stocks, à la concentration diagnostique

(CDC : <http://www.cdc.gov/malaria>)

Insecticides	Masse d'insecticide (mg) pour différents volumes d'acétone		
	100 ml	500 ml	1000 ml
Bendiocarb	<i>1,25</i>	<i>6,25</i>	<i>12,5</i>
Cyfluthrine	<i>1,25</i>	<i>6,25</i>	<i>12,5</i>
Cyperméthrine (alpha)	<i>1,25</i>	<i>6,25</i>	<i>12,5</i>
DDT	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>100</i>
Deltaméthrine	<i>1,25</i>	<i>6,25</i>	<i>12,5</i>
Fénitrothion	<i>5</i>	<i>25</i>	<i>50</i>
Lambdacyhalothrine	<i>1,25</i>	<i>6,25</i>	<i>12,5</i>
Malathion	<i>5</i>	<i>25</i>	<i>50</i>
Perméthrine	<i>2,15</i>	<i>10,75</i>	<i>21,5</i>
Pirimiphos-méthyl	<i>2</i>	<i>10</i>	<i>20</i>

ANNEXE 3 : Lavage et séchage des bouteilles avant leur imprégnation

- 1) Commencer par laver les bouteilles et les capuchons à l'eau claire ;
- 2) Mettre du savon liquide dans une bouteille, y ajouter de l'eau jusqu'au $\frac{3}{4}$ et répartir cette quantité d'eau savonneuse dans les autres bouteilles ;
- 3) Laver l'intérieur des bouteilles avec une brosse à lavage, en s'efforçant de bien parcourir les parois des bouteilles ;
- 4) Rincer les bouteilles et les capuchons jusqu'à ce qu'il ne reste plus de savon ;
- 5) Répéter cette opération de lavage à la brosse et rinçage à l'eau claire au moins 3 fois ;
- 6) Une fois toutes les bouteilles lavées, les rincer toutes au moins 10 fois à l'eau claire ;
- 7) Après ces 10 rinçages à l'eau claire, rincer encore avec de l'eau distillée, tout en tenant compte des parois externes des bouteilles ;
- 8) Placer les bouteilles (à l'envers dans leur position verticale) à l'étuve pendant 30 à 60 minutes, à une température de 65°C ;
- 9) Les capuchons sont lavés de la même manière, mais leur séjour dans l'étuve exige une température plus basse (40°C) ;
- 10) Récupérer ensuite les bouteilles bien sèches et attendre qu'elles se refroidissent pour entamer leur imprégnation ;
- 11) Pour s'assurer d'un bon lavage des bouteilles, on peut introduire quelques moustiques sensibles dans un échantillon de bouteilles venant d'être lavées ; les moustiques ne devraient pas mourir du tout, sinon reprendre l'opération de lavage.

ANNEXE 4 : Protocole d'imprégnation des bouteilles Wheaton CDC 250 ml

- 1) S'assurer d'abord que les bouteilles et les capuchons sont bien propres et secs ;
- 2) Utiliser des pipettes étiquetées, dont une est réservée uniquement à l'acétone (bouteille témoin) et les autres aux insecticides à tester (bouteilles à imprégner) ;
- 3) Ajouter 1 ml d'acétone (solvant) dans la bouteille témoin et bien la fermer avec son capuchon ;
- 4) Ajouter 1 ml d'insecticide à la dose diagnostique dans chacune des 4 bouteilles de test qui seront bien fermées avec leurs capuchons respectifs (numéroter les bouteilles et leurs capuchons) ;
- 5) Agiter légèrement la bouteille, maintenue en position verticale, de manière à ce que le fond soit bien imprégné d'insecticide ;
- 6) Inverser la bouteille et agiter pour imprégner l'intérieur du capuchon ;
- 7) Placer la bouteille sur ses flancs (en position horizontale) pendant un petit moment pour permettre à l'insecticide de se « rassembler ». Puis, tourner doucement la bouteille en décrivant un mouvement rotatoire, tout en la balançant légèrement pour imprégner toutes ses parois ;
- 8) Procéder de la même manière (6 à 8) pour toutes les bouteilles de test. Bien faire répartir également l'acétone contenue dans la bouteille témoin par le même procédé ;
- 9) Enlever ensuite les capuchons et continuer à rouler les bouteilles sur leur bord jusqu'à ce que l'intérieur soit totalement sec ;
- 10) Maintenir les bouteilles dans cette position horizontale et les couvrir d'un matériel qui puisse les préserver de la lumière. Si ces bouteilles imprégnées ne sont pas immédiatement utilisées, les placer dans un endroit sombre (un placard, par exemple), à l'abri de la lumière.