

ABREVIATIONS ET SIGLES

ADN: Acide désoxyribonucléique

AID: Aspersion intra domiciliaire d'insecticide à effet rémanent

An: Anopheles

ANSD: Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie

AS-PCR: Allèle Spécifique PCR

ATP : Adénosine Triphosphate

AIRS: Africa Indoor Residual Spraying

CDC: Centers for Disease Control

CTAB: Cétyltriméthylammonium bromure

CYP: Cytochrome P450

dNTP: désoxyribonucléotides

GABA: Acide gamma aminobutyrique

HR: Humidité Relative

IGS: Intergenic Spacer

IMP: Intentional Mismatch Primer

IPD: Institut Pasteur de Dakar

IRD: Institut de Recherche pour le Développement

IRS: Indoor Residual Spraying

IUPAC: Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

KD: Knock Down

Kdr: Knock down resistance

LAL: Lutte anti larvaire

LAV: Lutte anti vectorielle

LEVP: Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire

MILDA: Moustiques imprégnées d'insecticide à longue durée d'action

NaCl: Chlorure de Sodium

OMS: Organisation mondiale de la santé

PASA: PCR Amplification of Specific Alleles

PCR: Polymerase chain reaction

PNLP: Programme national de lutte contre le paludisme

rpm: rotation par minute

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris-Borate-EDTA

TPI: traitement préventif intermittent

UCAD: Université Cheikh Anta Diop de Dakar

UV: rayon ultraviolet

WHO: World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les différentes solutions de test	23
Tableau 2: Séquences des amorces pour l'identification des espèces du complexe <i>Gambiae</i> d'après (Wilkins et al, 2006).....	28
Tableau 3: Taille de l'échantillon de moustiques testés selon la localité.	30
Tableau 4: résultats de la sensibilité au Chlorfénapyr selon les localités	31
Tableau 5: Statut de la sensibilité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> selon la molécule et la localité	33
Tableau 6: Distribution des espèces d' <i>An. gambiae s.l.</i> dans les localités étudiées	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation du cycle de développement des Anophèles	6
Figure 2:Morphologie des Culicidae	10
Figure 3: le Chlorfénapyr	13
Figure 4: Bouteilles CDC de 250 ml (type Wheaton).....	16
Figure 5: Localisation géographique des sites d'études.....	19
Figure 6: Collecte et élevage des larves (image A, B, C).....	21
Figure 7: lavage des bouteilles A, séchage des bouteilles dans l'étuve (B et C)	22
Figure 8: Préparation des solutions de test (A B C)	23
Figure 9: Imprégnation et stockage des bouteilles imprégnées (A, B, C)	24
Figure 10: Test en bouteilles CDC	25
Figure 11: Taux de mortalité d' <i>An. gambiae</i> s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr à Dianké Makha	31
Figure 12: Taux de mortalité d' <i>An. gambiae</i> s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr respectivement à Diourbel et à Nioro.....	32
Figure 13: Taux de mortalité d' <i>An. gambiae</i> s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr à Koungheul	32
Figure 14: Taux de mortalité d' <i>An. gambiae</i> s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr à ZAC Mbao	33
Figure 15: Statut de la sensibilité des populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. selon la molécule et la localité	33

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1 Généralités sur les moustiques vecteurs du paludisme.....	3
I.1.1 Les vecteurs du paludisme au Sénégal.....	4
I.1.2 Systématique, cycle de développement et morphologie.....	5
I.1.2.1 Systématique.....	5
I.1.2.2 Cycle de développement.....	5
I.1.2.3 Morphologie.....	6
I.1.2.3.1 Les œufs	7
I.1.2.3.2 Les larves	7
I.1.2.3.3 La nymphe	8
I.1.2.3.4 L'adulte.....	8
I.2 Influence des facteurs climatiques et environnementaux.....	10
I.3 Lutte contre les vecteurs du paludisme	11
I.3.1 Les insecticides	11
I.3.1.1 Définition et modes d'action	11
I.3.1.2 Particularités et intérêt du Chlorfénapyr	12
I.3.2 La résistance aux insecticides.....	14
I.3.2.1 Définition	14
I.3.2.2 Principaux mécanismes	14
I.4 Evaluation de la sensibilité des vecteurs aux insecticides.....	14
I.4.1 Le test standard de l'OMS	15
I.4.2 Le test en bouteille du CDC	15
II MATERIELS ET METHODE	17
II.1 Présentation et choix des zones d'étude	17
II.1.1 Diourbel (Keur Serigne Mbaye Sarr).....	17
II.1.2 Dakar (ZAC Mbao)	17
II.1.3 Koungheul.....	18
II.1.4 Tambacounda (Dianké Makha)	18
II.1.5 Nioro (Keur Set).....	19
II.2 Echantillonnage et élevage des moustiques	19
II.2.1 Matériels de collecte des larves	19
II.2.2 Prospection des gîtes et récoltes de larves	20
II.2.3 Recueil des nymphes	20

II.2.4	Elevage des moustiques	20
II.3	Détermination de la sensibilité à différentes doses de Chlorfénapyr.....	21
II.3.1	Matériels du test	21
II.3.2	Lavage et séchage des bouteilles	21
II.3.3	Préparation des solutions de travail et conditions de conservation.....	22
II.3.4	Imprégnation et conservation des bouteilles.....	24
II.3.5	Tests en bouteilles CDC	24
II.3.5.1	Recherche d'une dose discriminante de Chlorfénapyr	25
II.3.5.2	Critères de validation et interprétation des résultats	26
II.3.5.3	Conservation des échantillons.....	26
II.4	Traitement des échantillons au laboratoire	27
II.4.1	Extraction d'ADN	27
II.4.2	Identification par PCR des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	27
II.4.2.1	Amplification par PCR.....	27
II.4.3	Electrophorèse et révélation	28
II.4.3.1	Electrophorèse	28
II.4.3.2	Révélation.....	29
III	RESULTATS ET DISCUSSION	30
III.1	Résultats globaux	30
III.1.1	Sensibilité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> à la chlorfénapyr	30
III.1.1.1	Dianké Makha.....	31
III.1.1.2	Diourbel (Keur Serigne Mbaye Sarr).....	31
III.1.1.3	Nioro (Keur Set).....	32
III.1.1.4	Koungheul.....	32
III.1.1.5	ZAC Mbao	32
III.1.2	Comparaison des résultats de mortalité du chlorfénapyr aux autres molécules testées....	33
III.1.3	Identification spécifique des espèces du complexe <i>An. gambiae s.l.</i> selon le district.....	34
III.2	Discussion.....	35
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	37
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	38
	ANNEXES.....	1

INTRODUCTION

Au plan mondial, malgré les progrès remarquables obtenus dans la lutte contre le paludisme, le nombre de cas est estimé à 219 millions en 2017 contre 239 millions en 2010 et 217 millions en 2016. En 2017, il a été noté une baisse de 20 millions des cas de paludisme par rapport à 2010. Les données pour la période 2015-2017 mettent en évidence l'absence de progrès significatifs par rapport à cet indicateur durant cette période.

La plupart des cas (92%) ont été enregistrés dans la région d'Afrique, loin devant la région d'Asie du Sud-Est (5 %) et la région de la Méditerranée orientale (2%). Quinze pays d'Afrique subsaharienne et l'Inde ont concentré quasiment 80% du total de cas de paludisme dans le monde. Parmi ces pays, cinq à eux seuls, ont enregistré près de la moitié des cas : il s'agit du Nigéria (25%), de la République Démocratique du Congo (11%), du Mozambique (5%), de l'Inde (4%) et de l'Ouganda (4%).

Le taux d'incidence du paludisme a globalement diminué entre 2010 et 2017, passant de 72 à 59 cas pour 1000 habitants soumis au risque. Ceci correspond à une réduction de 18% sur la période. Cependant, cette incidence de 59 cas pour 1000 habitants soumis au risque reste stable depuis ces trois dernières années avec une évolution variable selon les régions (WHO, 2018).

Au Sénégal, le fardeau de cette maladie a connu une régression significative de plus de 50% entre 2009 et 2015. En 2017, près de 349 000 cas de paludisme ont été confirmés sur près de 396 000 cas notifiés (PNLP, 2018).

En Afrique, la population n'ayant pas accès aux outils permettant de prévenir et de traiter la maladie se compte par millions. Le manque de financements suffisants et la fragilité des systèmes de santé restreignent l'accès aux interventions essentielles et compromettent la réalisation des objectifs mondiaux (WHO, 2016).

L'urbanisation a sans doute un impact considérable sur la composition spécifiques des populations de vecteurs et la dynamique de transmission du paludisme.

Une lutte efficace contre les vecteurs du paludisme dépend de la connaissance des espèces de vecteurs locaux et leur sensibilité aux insecticides, ainsi que les comportements des vecteurs et des humains qui permettent aux moustiques d'éviter tout contact avec les insecticides afin de maintenir une transmission résiduelle. La collecte périodique de ces données est essentielle pour éclairer les stratégies de lutte anti vectorielle et suivre leur impact sur la transmission du paludisme (WHO, 2015).

Les vecteurs du paludisme ont en effet acquis une résistance généralisée à bon nombre d'insecticides actuellement utilisés, y compris les pyréthrinoïdes synthétiques. Il est donc urgent de mettre au point d'autres insecticides pour lutter efficacement contre les vecteurs résistants aux insecticides actuellement disponibles.

Pour évaluer la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides, les méthodes employées, selon les recommandations de l'OMS, reposent sur des tests standardisés, tels que les tests biologiques de l'OMS (OMS, 1998) ou du CDC (Brogdon & McAllister, 1998). Ces méthodes consistent à exposer une population de moustiques d'une zone déterminée (souche locale) à une dose discriminante d'un insecticide donné pendant un temps diagnostique afin de déterminer son statut vis-à-vis de l'insecticide testé.

L'objectif général de cette étude est de déterminer la concentration minimale efficace du Chlorfenapyr en testant plusieurs concentrations sur des populations sauvages d'*An. gambiae s.l.* à l'aide de la méthode des bouteilles du CDC.

I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Généralités sur les moustiques vecteurs du paludisme

La découverte par Alphonse Laveran des parasites dans le sang de patients atteints de paludisme en 1880 marque le début de la connaissance du paludisme. Plus tard, Ronald Ross démontra que les parasites humains du paludisme étaient transmis par des moustiques du genre *Anopheles* (Ross, 1897). Le paludisme est donc une infection parasitaire due à un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium* transmis par des moustiques femelles du genre *Anopheles* (OMS, 2007). Cinq espèces du genre *Plasmodium* sont impliquées : *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. falciparum*.

P. falciparum est le parasite du paludisme le plus prévalent dans la région Afrique de l'OMS. Il est en effet à l'origine de 99,7 % des cas de paludisme estimés en 2017, tout comme dans les régions d'Asie du Sud-Est (62,8 %), de la Méditerranée orientale (69 %) et Pacifique occidental (71,9 %). *P. vivax* prédomine dans la région Amérique de l'OMS où il représente 74,1% des cas de paludisme (OMS, 2018).

Les moustiques ont un rôle dans les écosystèmes mais avant tout en épidémiologie humaine et animale. En plus de leur caractère nuisant par les piqûres qu'ils infligent, ils représentent le groupe le plus important de vecteurs d'agents pathogènes transmissibles à l'être humain mais également de zoonoses. Ils sont vecteurs principalement de trois groupes d'agents pathogènes pour l'être humain: *Plasmodium*, filaires ainsi que de nombreux arbovirus.

Les anophèles femelles prélèvent le parasite en prenant sur un sujet infecté au cours de leur repas de sang. Ce dernier est indispensable pour le développement de leurs œufs. Les parasites se développent ensuite dans l'organisme de l'insecte. Lorsque la femelle du moustique se nourrit de nouveau, elle inocule les parasites avec sa salive dans le sang d'un nouvel individu. De ce fait, la lutte contre cette maladie exige sans doute une bonne connaissance de la biologie des *Plasmodium*, d'une part et, d'autre part, de la bio-écologie des anophèles vecteurs.

La multiplication des parasites se fait de façon rapide dans le foie, puis dans les globules rouges du sujet infecté. Une à deux semaines plus tard, les premiers symptômes du paludisme se manifestent: en général de la fièvre, des céphalées, des frissons et des vomissements. S'il n'est pas traité rapidement au moyen de médicaments efficaces, le paludisme peut tuer en infectant et en détruisant les globules rouges, puis en obstruant les capillaires qui irriguent le cerveau et d'autres organes vitaux.

Ces dernières années, on a enregistré aussi certains cas de paludisme du singe chez des humains dans des zones de forêts d'Asie du Sud-Est (WHO, 2016). Le paludisme est une affection fébrile

aigue. Chez un sujet non immunisé, les symptômes apparaissent généralement au bout de 10 à 15 jours après la piqûre de moustique infectante. Les premiers symptômes (fièvre, maux de tête et frissons) peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme. S'il n'est pas traité dans les 24 heures, le paludisme à *Plasmodium falciparum* peut évoluer vers une affection sévère souvent mortelle (OMS, 2018).

À ce jour, environ 3 546 espèces de moustiques réparties en 111 genres sont inventoriées dans le monde. Parmi elles, seules une soixantaine d'espèces assure la transmission des *Plasmodium* humains (Carnevale & Robert, 2009).

I.1.1 Les vecteurs du paludisme au Sénégal

Une vingtaine d'espèces anophéliennes ont été décrites au Sénégal (Diagne *et al.*, 1994). Parmi ces espèces, une demi-douzaine sont connues pour leur implication dans la transmission du paludisme (*An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. melas*, *An. nili* et *An. pharoensis*). *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus* ont une large distribution et un rôle prépondérant dans la transmission tandis qu'*An. melas*, *An. nili*, *An. pharoensis* sont confinés dans certaines zones géographiques et ont un rôle vectoriel secondaire. *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont sympatriques dans presque tout le territoire et leurs fréquences relatives varient en fonction des conditions climatiques. *An. arabiensis* est plus abondant en zones sahéliennes et soudano-sahéliennes alors qu'*An. gambiae* est prédominant dans les zones de savane humide (Vercruyssse *et al.*, 1981; Vercruyssse, 1985; Petrarca *et al.*, 1987; Dia *et al.*, 2008; Lemasson *et al.*, 1997; Fontenille *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1998). *An. melas* du fait de ses affinités aux eaux saumâtres, est localisé sur le long du littoral mais également à l'intérieur des terres le long des cours d'eau du Sine-Saloum et de la Casamance jusqu'aux limites de la remontée des eaux marines. Il est également présent dans les zones de mangrove du Sine-Saloum, de basse Casamance et de Saint-Louis (Diop *et al.*, 2002). *An. funestus*, absent auparavant des zones sahéliennes suite aux sécheresses récurrentes des années 70, est actuellement présent dans toutes les zones biogéographiques du Sénégal notamment dans les localités à proximité de zones marécageuses ou de cours d'eau (Dia *et al.*, 2003, 2008). *An. pharoensis* est présent également dans toutes les zones biogéographiques mais est prédominant surtout dans les zones de rizières de la vallée du fleuve Sénégal et de Casamance (Faye *et al.*, 1995). La présence d'*An. nili* est signalée uniquement dans la zone du Sénégal oriental et de Casamance (Dia *et al.*, 2003, 2005).

I.1.2 Systématique, cycle de développement et morphologie

I.1.2.1 Systématique

Plusieurs espèces vectrices de parasitoses ou d'arboviroses sont des *Culicidae* (moustiques) appartenant à:

- l'embranchement des arthropodes (pattes articulées),
- la classe des insectes (corps segmenté en trois parties),
- la sous classe des ptérygotes (présence d'ailes),
- l'ordre des diptères (deux ailes fonctionnelles)
- le sous-ordre des nématocères (antennes rondes et longues).
- La famille des *Culicidae*

Cette famille comprend trois sous familles:

- les *Anophelinae* (avec les genres *Anopheles*, *Bironella* et *Chagasia*),
- les *Culicinae* (*Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, etc.) et
- les *Toxorhynchitinae* (*Toxorhynchites*) (Knight & Stone, 1977).

I.1.2.2 Cycle de développement

Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète (insectes holométaboles). Leur cycle biologique comprend deux (2) phases:

Une phase aquatique qui concerne les stades pré-imaginaux ou immatures: œuf, larves (avec 4 stades larvaires différents par leur taille entrecoupés chacun d'une mue) et nymphe. Après une dizaine de jours environ, la dernière mue transforme la larve du 4e stade en une nymphe qui ne se nourrit pas et subit d'importants bouleversements morphologiques, libérant l'anophèle adulte en un à deux jours environ.

Une phase aérienne qui concerne le stade adulte ou imaginal, avec des mâles et des femelles.

C'est à ce stade que s'effectue la reproduction et la dispersion. Le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés, tandis que la femelle s'alimente non seulement du nectar des fleurs pour disposer de l'énergie nécessaire pour le vol mais aussi de sang humain ou animal pour la maturation des œufs. Cependant seule la femelle est hématophage. C'est au cours d'un repas sanguin qu'elle peut ingérer le parasite et le transmettre plus tard (Carnevale & Robert, 2009).

Chaque espèce de moustique préfère pondre ses œufs dans une collection d'eau particulière (OMS, 2013). Les gîtes préférentiels des anophèles sont généralement des eaux douces, claires avec ou sans végétation. Ces points d'eau comprennent les mares temporaires ou permanentes, des flaques d'eau de pluie, des puits, des bassins etc. Toutefois, certaines espèces se développent dans

des eaux saumâtres (*An. melas* et *An. merus*) ou dans des sources d'eau thermales (Gillies & De Meillon, 1968).

Le développement larvaire est influencé par la température, la luminosité et la quantité de nourriture. C'est une période de croissance avec une augmentation notable de la taille du stade un au stade quatre, qui peut être de l'ordre de 10 fois. Le dernier stade nymphal se termine par l'émergence qui marque le passage à la vie adulte.

La femelle s'accouple généralement juste après l'émergence en s'introduisant dans les essaims formés par les mâles. La vie de la femelle est ensuite rythmée par un cycle de prise de repas sanguin sur un hôte vertébré.

En fonction des comportements de piqûre des imagos et des habitudes de repos, on distingue des populations endophages et exophages qui s'alimentent respectivement à l'intérieur ou à l'extérieur des habitations.



Figure 1: Représentation du cycle de développement des Anophèles

I.1.2.3 Morphologie

Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète (insectes holométaboles) de sorte que l'adulte, la larve et la nymphe ont des morphologies très différentes, adaptées à leurs modes de vie, aquatique pour les stades pré imaginaires et aérien pour le stade adulte ou imaginal. (Carnevale & Robert, 2009).

I.1.2.3.1 Les œufs

Une ponte d'anophèle est composée habituellement de 50 à 300 œufs, de forme allongée, chacun ayant 1/2 millimètre de longueur. Les œufs sont pondus de couleur blanche, puis brunissent. Les œufs d'*Anopheles* sont pondus isolément, en vol, sur la surface de l'eau, et possèdent généralement deux flotteurs latéraux. Ces œufs sont soumis au jeu des tensions superficielles, se regroupent parfois par leur extrémité pour former des sortes d'étoiles (à 6 œufs) sur l'eau. Les œufs d'anophèle ne résistent généralement pas à la dessiccation et éclosent dans les 48 heures après l'oviposition, dès que l'embryon est entièrement développé. Ce délai est allongé lorsque la température diminue (Carnevale & Robert, 2009).

I.1.2.3.2 Les larves

Les larves d'anophèle se reconnaissent des autres larves d'insectes aquatiques par, entre autres, l'absence de pattes et un thorax relativement gros.

Au cours de son développement, la larve subit 3 mues et passe ainsi par 4 stades larvaires morphologiquement comparables. La mue qui survient entre chaque stade permet l'accroissement de la taille de la larve pendant que la nouvelle cuticule durcit. Au stade IV, la larve d'anophèle mesure environ 12 à 15 mm. Morphologiquement, la larve se compose de trois parties: la tête, le thorax et l'abdomen (Carnevale & Robert, 2009).

✓ Tête:

La tête porte les 2 antennes, 2 gros yeux composés, une paire de brosses buccales qui servent à créer un courant d'eau apportant les particules alimentaires (levures, bactéries, micro-planctons, micro-algues, grains de pollen, etc.) au niveau de la bouche qui est en position ventrale.

Chez les anophèles, la larve s'alimente en surface (surface feeder), tandis qu'elle s'alimente en profondeur chez les autres moustiques de la sous-famille Culicinae. La tête comporte en effet de nombreuses soies qui sont utilisées pour la diagnose spécifique (identification des espèces), notamment les soies préclypéales internes et externes. À l'éclosion, la larve de stade I mesure 1 à 2 mm ; elle présente, sur la tête, une dent d'éclosion qui a servi à percer, et ouvrir, le chorion de l'œuf. Cette dent n'existe pas chez les stades ultérieurs (Carnevale & Robert, 2009).

✓ Thorax

La liaison entre la tête et le thorax se fait par l'intermédiaire d'une membrane, au niveau du cou, qui permet la rotation à 180° de la tête lors de l'alimentation.

Le thorax n'apparaît pas segmenté, mais il se compose de 3 segments coalescents (pro-, méso- et métathorax), chacun portant de nombreuses soies dont la forme et la taille diffèrent selon leur implantation et selon les espèces. Ces soies ont reçu une numérotation (chétotaxie) et sont utilisées pour la diagnose spécifique (Carnevale & Robert, 2009).

✓ Abdomen

Il comprend 9 segments bien visibles, chacun portant différentes ornements, notamment la plaque tergale et les plaques accessoires, des soies simples, branchues ou palmées, etc. qui sont utilisées pour l'identification des différentes espèces. Les larves d'anophèles vivent dans l'eau, s'alimentent, effectuent des mues et respirent l'air atmosphérique. La durée de vie larvaire est d'une à deux semaines selon les espèces et les conditions écologiques (dont la température) (Carnevale & Robert, 2009).

I.1.2.3.3 La nymphe

La fin de la vie larvaire est suivie d'une métamorphose complète; la cuticule de la larve se fend longitudinalement pour laisser place à une nymphe.

Le stade nymphal est caractérisé par:

- La coalescence de la tête et du thorax qui forment un céphalothorax volumineux ;
- La nymphe est mobile grâce à des contractions brusques de l'abdomen qui lui permettent de se déplacer efficacement et d'échapper aux prédateurs ;
- elle a une respiration aérienne via deux trompettes respiratoires situées non plus à l'extrémité de l'abdomen comme la larve, mais reliées latéralement sur le céphalothorax, et qui affleurent à la surface de l'eau lorsque la nymphe est au repos ;
- elle ne s'alimente pas

La durée de vie de la nymphe est courte, un à deux jours généralement, rarement plus (3-5 jours maximum selon la température). La nymphe représente le dernier stade de la vie pré-imaginale, et de la phase aquatique.

Au moment de l'émergence, la nymphe mature se positionne juste sous la surface de l'eau, une suture ecdisiale située sur la face dorsale du thorax se fend longitudinalement et laisse sortir l'adulte hors de l'exuvie nymphale et donc hors de l'eau.

Cette émergence ne dure que quelques minutes. C'est une phase spectaculaire et délicate de la vie du moustique qui est alors exposé aux risques des prédateurs comme aux moindres mouvements d'air ou d'eau, entraînant la noyade (Carnevale & Robert, 2009).

I.1.2.3.4 L'adulte

L'adulte ou imago mène une vie aérienne. Morphologiquement, l'adulte comprend trois parties:

- La tête (avec des yeux composés, une trompe, des palpes et un appareil buccal de type suceur pour le mâle et de type piqueur-suceur chez la femelle),
- Le thorax (avec trois paires de pattes, une paire d'ailes et deux balanciers) et

- L’abdomen (comprenant l’appareil reproducteur au niveau du 7ème segment abdominal pour le mâle et entre le 8ème et 9ème segment abdominal pour la femelle).

On remarque qu’au repos, les anophèles adoptent généralement une position oblique par rapport au support, les différenciant facilement des autres *Culicinae* qui se positionnent parallèlement au support (Carnevale & Robert, 2009).

Leur accouplement a lieu peu après l’émergence. La femelle ne s’accouple en général qu’une seule fois, parce qu’elle reçoit à ce moment-là suffisamment de sperme pour féconder les œufs durant les pontes successives.

On note chez les anophèles une agressivité avec des tranches horaires différentes: la plupart des anophèles piquent la nuit, certains au crépuscule; d’autres piquent plus tard, au milieu de la nuit ou même tôt le matin. Il existe des moustiques dites endophages c’est-à-dire qui piquent à l’intérieur des habitations, et d’autres dites exophages c’est- à-dire qui piquent à l’extérieur des habitations. Après son repas de sang, le moustique se repose en général pendant une courte période. Les moustiques qui ont pénétré dans une maison se reposent habituellement sur un mur, sous le mobilier ou sur les vêtements pendus. On dit alors qu’ils sont endophiles. Les moustiques qui piquent à l’extérieur se reposent en général sur la végétation, dans des trous, dans les arbres, sur le sol ou dans d’autres endroits frais et sombres; on les qualifie d’exophiles.

Les préférences trophiques c’est-à-dire les hôtes de prédilection, varient selon les espèces. Certains moustiques préfèrent le sang humain et sont qualifiés de moustiques anthropophiles. Par contre d’autres ont un tropisme vers les animaux, ce sont des moustiques zoophiles. Ceux qui préfèrent le sang humain sont les plus dangereux, car ils sont capables de transmettre l’infection dans les populations humaines (OMS, 2014).

Leurs gîtes sont nombreux et variés: On peut trouver les adultes sur la végétation, sur des surfaces solides dans des endroits protégés, sur les rives des cours d’eau et des fossés, des trous de rochers, des caniveaux, des fissures, des grottes, des terriers, des troncs d’arbres ou des termitières (OMS, 2013).

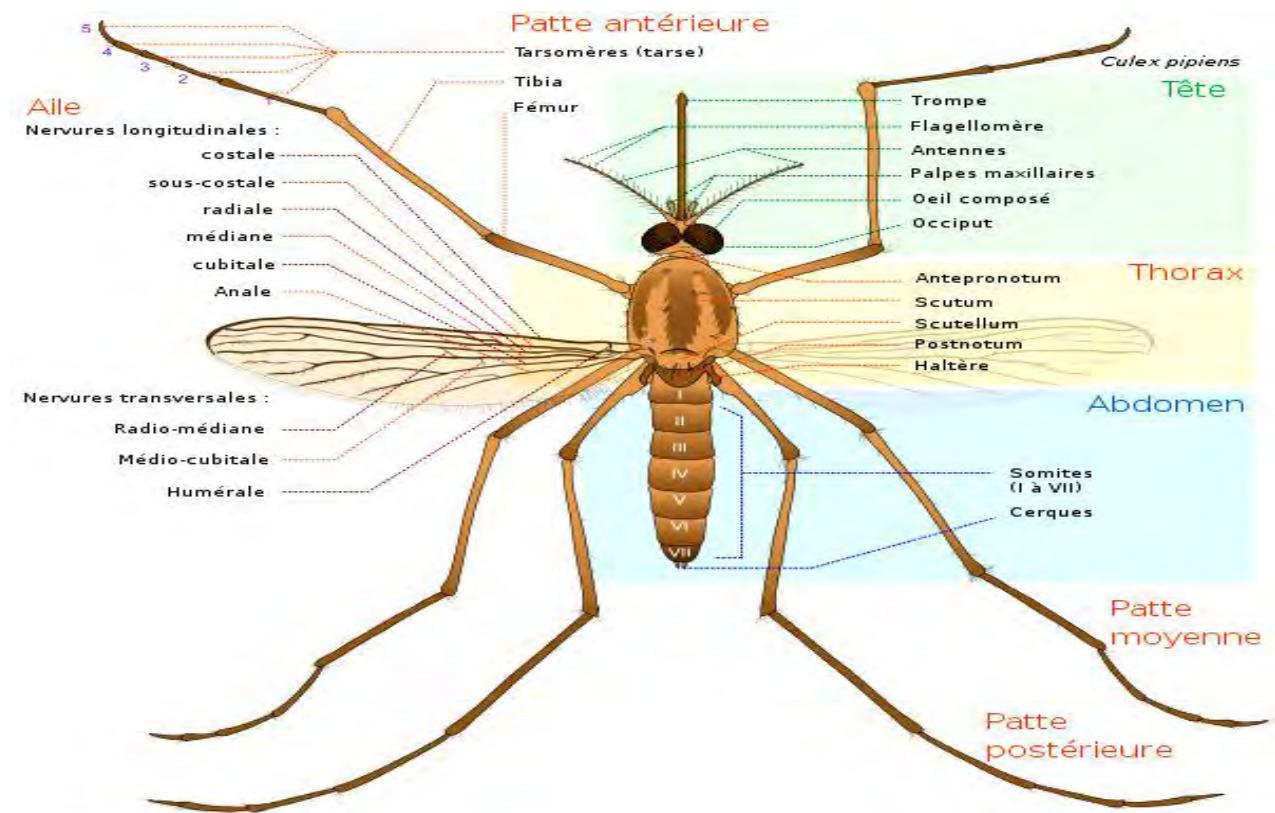


Figure 2:Morphologie des Culicidae

I.2 Influence des facteurs climatiques et environnementaux

La question du « réchauffement » de la planète et de son impact sur l'expansion du paludisme est d'actualité (LOEVINSOHN, 1994 ; JETTEN et al., 1996 ; LINDSAY & BIRLEY, 1996; MARTENS et al., 1999 ; MOUCHET & MANGUIN, 1999; PASCUAL et al., 2006, PATZ & OLSON, 2006 ; THOMSON et al., 2006).

Selon l'OMS, plus de 6 % des cas de paludisme dans certaines régions du monde durant les 25 dernières années sont le résultat de changements climatiques. De façon générale, les températures ont augmenté ces dernières décennies sur toute la surface terrestre, surtout dans les zones tempérées et polaires. Et l'on s'attend à ce que les gaz à effet de serre et la température continuent d'augmenter » (National Geographic, octobre 2004).

Le développement des moustiques est en effet contrôlé par plusieurs facteurs dont les facteurs climatiques restent les plus déterminants. C'est le cas notamment de la température, de la pluviométrie et de l'humidité relative. D'une manière générale, ces facteurs extrinsèques jouent un rôle important sur le développement larvaire. En effet, les stades immatures de certaines espèces comme celles d'*An. funestus*, d'*An. darlingi* et même celles du complexe *An. gambiae*, sont très sensibles aux fluctuations thermiques. Si la température de l'eau augmente, ces stades accélèrent leur maturité (Rueda et al., 1990) et produisent une descendance abondante. Cet effet est aussi noté chez les femelles adultes. Celles-ci digèrent plus rapidement le sang et s'alimentent d'une

manière fréquente (Gillies, 1953), ce qui peut conduire à une augmentation de l'intensité de la transmission. Cette élévation de la température influe également sur les œufs. Ces derniers éclosent d'une manière rapide en climat tropical (2 à 3 jours) qu'en climat tempéré.

Par rapport à la pluviométrie, des études ont montré que les changements de ce facteur est d'une grande importance dans la mesure où une espèce peut être abondante pendant l'hivernage et se retrouver avec une faible densité pendant la saison sèche. Ce phénomène est lié à la présence ou à l'absence de ses gîtes larvaires préférentiels.

Par contre un réchauffement au-delà de 34°C en général a un impact négatif sur la survie des vecteurs et des parasites (Rueda *et al.*, 1990).

I.3 Lutte contre les vecteurs du paludisme

La lutte anti-vectorielle repose sur quatre principales approches de lutte (chimique, biologique, mécanique et génétique) dirigées contre les stades aquatiques (lutte anti-larvaire ou LAL) et les adultes/imagos (lutte imagocide). De nos jours, la lutte chimique par l'aspersion intra-domiciliaire d'insecticide à effet rémanent (AID) et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) restent les mesures de LAV les plus utilisées (OMS, 2012). Les autres mesures, moins utilisées, sont des mesures complémentaires ou éventuellement alternatives à la lutte chimique. Les mesures de lutte biologique et mécanique ciblent généralement les populations larvaires pour empêcher leur développement jusqu'à l'émergence et impactant ainsi sur la densité des populations imaginaires. En outre, de récents travaux sur la lutte génétique ont eu pour but d'empêcher le développement sporogonique chez les vecteurs (Riehle *et al.*, 2008, Crawford *et al.*, 2013). Il faut, cependant, souligner la difficulté de la mise en œuvre de ces mesures et souvent de leur manque d'efficience ; ce qui a eu pour conséquence le recours à la lutte chimique, basée sur l'utilisation d'insecticides, comme principale mesure de lutte contre les vecteurs.

I.3.1 Les insecticides

I.3.1.1 Définition et modes d'action

Les insecticides sont des substances actives ou des préparations ayant la propriété de tuer les insectes ou d'autres arthropodes tels que les acariens.

Ainsi, les insecticides utilisés dans les programmes de contrôle vectoriel appartenaient essentiellement à quatre classes chimiques: les **pyréthrinoïdes** (alpha-cyperméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, cyfluthrine, perméthrine, etofenprox), les **organochlorés**

(Dichloro-Diphényl-Trichloro-éthane, dieldrine), les **carbamates** (bendiocarb, propoxur) et les **organophosphorés** (malathion, fénitrothion, pirimiphos-méthyl, téméphos).

Le système nerveux des insectes constitue la cible principale de ces insecticides. Ces derniers agissent plus précisément au niveau des canaux ioniques voltage-dépendants (canal sodium) ou sur des récepteurs ionotropes (récepteurs cholinergiques de type nicotinique, à GABA, à L-glutamate).

I.3.1.2 Particularités et intérêt du Chlorfénapyr

Les vecteurs du paludisme ayant acquis une résistance généralisée à nombre d'insecticides actuellement utilisés, y compris les pyréthrinoïdes synthétiques. Il est donc urgent de mettre au point d'autres insecticides pour lutter efficacement contre la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme (Raghavendra *et al.*, 2011).

En effet, les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action et les pulvérisations à effet rémanent à l'intérieur des habitations sont les pierres angulaires de la prévention du paludisme, en particulier en Afrique subsaharienne. Mais 60 pays ont déjà signalé une résistance à au moins une classe d'insecticide. Le problème tient en partie au fait qu'il n'y avait auparavant que quatre classes d'insecticides recommandées par l'OMS pour la lutte contre les moustiques adultes. Une seule (la classe des pyréthrinoïdes), est recommandée pour les moustiquaires imprégnées d'insecticide longue durée. L'utilisation continue des mêmes insecticides a permis aux moustiques hautement adaptables de développer des niveaux de résistance importants. Des alternatives sont nécessaires de toute urgence. C'est dans ce contexte que le **chlorfénapyr** un nouvel insecticide doté d'un nouveau mode d'action est un candidat prometteur.

Sa formule chimique (Nom IUPAC de la substance chimique) est 4-bromo-2-(4-chlorophenyl)-1-ethoxymethyl-5-trifluoromethyl-1H-pyrrole-3-carbonitrile.

Le chlorfénapyr est un insecticide de la classe des pyrroles couramment utilisé contre les acariens et les termites. Il agit comme découpleur de la phosphorylation par oxydation. Ce composé perturbe le gradient de proton à travers les membranes mitochondriales, interrompant la synthèse de l'ATP et entraînant la mort de l'organisme (Ngufor *et al.*, 2016 ; Raghavendra *et al.*, 2011).

Le chlorfénapyr est utilisé dans le commerce pour lutter contre les termites et protéger les cultures contre divers insectes et acariens nuisibles (Lovell *et al.*, 1990; Pimplale *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 1998). Le chlorfénapyr est un pro-insecticide. L'élimination par oxydation du groupe N-éthoxyméthyle du chlorfénapyr par des oxydases à fonctions mixtes conduit à une forme toxique identifiée comme CL 303268 qui fonctionne pour découpler la phosphorylation oxydante dans les

mitochondries, entraînant une perturbation de la production d'ATP et une perte d'énergie conduisant à un dysfonctionnement cellulaire et à la mort ultérieure de l'organisme. Cette molécule a une faible toxicité sur les mammifères et est classée comme insecticide légèrement dangereux selon les critères de l'OMS (Tomlin *et al.*, 2000).

C'est un insecticide nouveau dans la lutte antivectorielle de la classe des pyrroles (Raghavendra *et al.*, 2011, Black *et al.*, 1994). Les pyrroles sont des insecticides à large spectre, qui présentent une toxicité au contact et à l'estomac (N'Guessan *et al.*, 2007, Gunning *et al.*, 2002). Ce sont des pro-insecticides qui nécessitent une activation initiale par des oxydases à fonctions mixtes pour produire le composé actif (Black *et al.*, 1994).

Le mode d'action (effet létal) du Chlorfénapyr nécessite plusieurs étapes:

- métabolisme du Chlorfenapyr en sa forme active, par l'intermédiaire des mono oxygénases à cytochrome P450,
- cette forme active (CL 303268) empêche la production d'ATP par la mitochondrie, ainsi les cellules cessent de fonctionner.
- Le chlorfenapyr induit une mortalité au bout de 72 heures post-exposition.

Contrairement aux pyréthrinoïdes et à toutes les autres classes d'insecticides actuellement approuvés pour lutter contre les moustiques adultes, le site d'action des pyrroles n'est pas le système nerveux de l'insecte. Mais les pyrroles quant à eux, agissent au niveau cellulaire et perturbent les voies respiratoires et les gradients de protons par le découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Black *et al.*, 1994). Lorsqu'il est appliqué sur des moustiquaires occupées par des volontaires humains lors des essais expérimentaux sur des cabanes, le chlorfénapyr induit des taux de mortalité relativement élevés chez les moustiques à la recherche d'hôte, quel que soit leur degré de résistance aux pyréthroïdes (N'Guessan *et al.*, 2009, Mosha *et al.*, 2008).

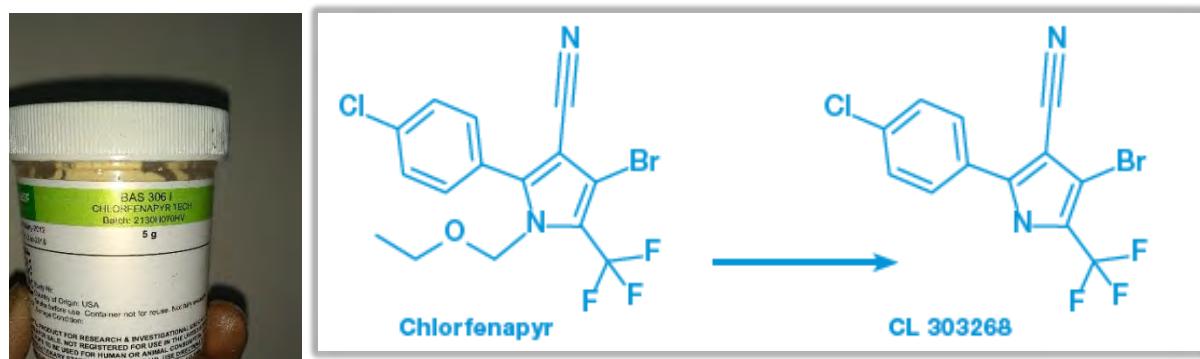


Figure 3: le Chlorfénapyr

I.3.2 La résistance aux insecticides

I.3.2.1 Définition

La résistance est définie comme la sélection d'un caractère héréditaire entraînant l'échec répété d'un insecticide à fournir le niveau de contrôle attendu au sein d'une population d'insectes bien qu'utilisé selon les recommandations d'usage (IRAC, 2011). La résistance aux insecticides est de plus en plus répandue et on rapporte qu'elle touche désormais près de deux tiers des pays où la transmission persiste. Elle concerne toutes les principales espèces de vecteurs et toutes les classes d'insecticides (OMS, 2012). Cette situation est la conséquence d'une utilisation de plus en plus importante et souvent de manière incontrôlée d'insecticides aussi bien en santé publique que dans l'agriculture. Ceci a pour conséquence l'augmentation de la pression insecticide exercée sur la population vectorielle, à l'origine de l'expansion des phénomènes de résistance aux insecticides. En effet, à l'heure actuelle, la résistance à au moins un insecticide a été observée dans 64 pays où le paludisme continue d'être transmis. Dans ces zones, la résistance aux pyréthrinoïdes semble la plus communément répandue. Dans ce contexte, l'OMS a exhorté les pays concernés à mettre en place un programme pour la gestion de la résistance aux insecticides.

I.3.2.2 Principaux mécanismes

La gestion de la résistance aux insecticides est complexe par le fait qu'elle est liée à plusieurs mécanismes. En effet, les mécanismes de résistance primaire peuvent être répartis en deux groupes : la résistance métabolique et la résistance liée à la modification de cible.

- La résistance métabolique résulte de modifications dans les systèmes enzymatiques du moustique qui entraînent une détoxication de l'insecticide plus rapide que la normale. Cette détoxication empêche l'insecticide d'atteindre sa cible à l'intérieur de l'insecte. Dans le cas des vecteurs du paludisme, on pense que trois systèmes enzymatiques jouent un rôle important dans la métabolisation des insecticides : les estérases, les mono oxygénases et les glutathion S-transférases.
- La résistance liée à la modification de cible intervient lorsqu'il y a une mutation du récepteur protéinique, cible de l'insecticide. Il en résulte une suppression ou une diminution de l'affinité de la cible pour l'insecticide (OMS, 2017).

I.4 Evaluation de la sensibilité des vecteurs aux insecticides

Pour déterminer la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides, les méthodes employées, selon les recommandations de l'OMS, reposent sur des tests de bioessais standardisés : le Kit test OMS (cylindres OMS) et le test en bouteille du CDC (CDC Bottle Bioassay). Ce sont

des méthodes qui consistent à exposer une population de vecteurs de la zone d'étude (souche locale) à une dose discriminante d'un insecticide donné pendant un temps diagnostique afin de déterminer son statut vis-à-vis de l'insecticide testé. Ainsi dans le cadre de l'étude de la sensibilité d'*An. gambiae* s.l. au **chlorfénapyr**, les tests ont été réalisés par la méthode des bouteilles du CDC (CDC Bottle Bioassay).

I.4.1 Le test standard de l'OMS

Vector Control Research Unit, University Sains Malaysia, Penang (Malaisie) qui est un centre collaborateur, est chargé de produire les kits de test et les papiers imprégnés d'insecticide sous la coordination de l'OMS. Ce test utilise des tubes cylindriques en plastique dont l'intérieur est tapissé de papier imprégné à la dose diagnostique de l'insecticide à tester. Ainsi le principe du test consiste à exposer pendant 1 heure (ce temps est variable selon les insecticides et certaines espèces de moustiques). Un échantillon de moustiques adultes à tester et à déterminer leur mortalité après 24 heures d'observation post-exposition, comparativement à des témoins non exposés. Il s'agit d'une méthode simple, pouvant être accomplie aussi bien au laboratoire que sur le terrain.

I.4.2 Le test en bouteille du CDC

Le test en bouteille du CDC (Centers for Disease Control, Atlanta, USA) est une autre méthode de détection de la sensibilité/résistance aux insecticides chez des populations de vecteurs. Il permet de déterminer si une formulation particulière d'insecticide est efficace pour un contrôle vectoriel dans une zone donnée et en un temps bien précis.

Le test en bouteille du CDC se base sur les résultats du temps de mortalité, qui correspond au temps que prend un insecticide pour «pénétrer» un vecteur, traverser ses tissus intermédiaires, parvenir au site cible et agir à ce niveau. Comme son nom l'indique, le test utilise des bouteilles de 250 ml dont l'intérieur est imprégné d'un insecticide à une dose diagnostique à laquelle sont exposés des moustiques adultes à jeun et âgés de 2 à 5 jours, pendant un temps donné appelé temps diagnostique. En effet un des avantages du test bouteille est de pouvoir évaluer différentes concentrations pour un même insecticide et de tester certains insecticides pour lesquels les papiers ne seraient pas disponibles (Thiaw, 2014).



Figure 4: Bouteilles CDC de 250 ml (type Wheaton)

II MATERIELS ET METHODE

II.1 Présentation et choix des zones d'étude

Les critères retenus pour le choix de ces sites d'étude ont tenu compte de l'importance de leurs caractéristiques éco-épidémiologiques du paludisme, de leurs diversités éco-géographiques et de l'existence de données entomologiques antérieures.

Les études ont été menées dans les zones de Diourbel, Dakar, Koungheul, Nioro et Tambacounda.

II.1.1 Diourbel (Keur Serigne Mbaye Sarr)

Diourbel est une région située à l'Est de Dakar, accessible par la Route Nationale n°3. Avec une superficie de 4 769 km², c'est la région la moins étendue du pays, cependant elle compte 1 543 646 habitants (ANSD, 2015). Elle est caractérisée par sa topographie plane et un climat de type soudano-sahélien, chaud et sec, des précipitations de 3 à 4 mois faibles et irrégulières. La température moyenne annuelle varie entre 26 et 32°C (ANSD, 2015).

Les sols sont essentiellement formés de sédiments sableux ou sablo-argileux d'origine éolienne et alluviale (ANSD, 2015). Par ailleurs le secteur économique de la région est essentiellement dominé par l'agriculture qui mobilise plus 54% de la population avec des rendements qui toutefois ne représentent pas l'essentiel du PIB régional. L'artisanat est un secteur traditionnel pourvoyeur d'emplois. A cela s'ajoute le commerce (ANSD, 2015).

Sur le plan environnemental, la ville de Diourbel présente toutes les conditions favorables à la prolifération des moustiques. Entre autres les flaques d'eau, le manque d'assainissement et les bassins de rétention sont des facteurs qui contribuent au maintien de la pullulation du vecteur du paludisme et de la transmission de la maladie (ANSD, 2015)

II.1.2 Dakar (ZAC Mbao)

Mbao est un village traditionnel Lebou qui a été érigée en commune en 1996. C'est l'une des 16 communes d'arrondissement de la ville de Pikine située dans la presqu'île du Cap-Vert qui coïncide avec le département de Pikine dans la région de Dakar. Etant dans la banlieue dakaroise, Pikine se situe dans la formation écologique des Niayes. Située le long du littoral nord sénégalais appelé communément Grande côte, la zone des Niayes s'étend de Dakar à Saint-Louis sur une bande de terre de 180 km de long et de 5 à 30 km de large. Les Niayes sont des dépressions inter dunaires plus ou moins inondables constituant une zone agro écologique d'une importance capitale dans l'économie du Sénégal. Elles représentent la principale zone de cultures maraîchères du Sénégal et offrent de bonnes conditions pour l'arboriculture. La présence d'une façade maritime qui ceinture presque toute la région, offre un climat de type canarien qui subit fortement

l'influence des facteurs géographiques et atmosphériques (ANSD, 2008). La pluviométrie est caractérisée par une durée relativement courte, variant entre trois et quatre mois (de juin à octobre). Elle est marquée, d'une part, par une inégale répartition dans le temps et dans l'espace et, d'autre part, par une faiblesse des quantités d'eau enregistrées (ANSD, 2014). Il est important de souligner que la région de Dakar se situe entre les isohyètes 300 et 600 mm. La température varie entre 17 et 25° C (degrés Celsius) de décembre à avril et de 27 à 30 ° C de mai à novembre. En outre, Mbao abrite la raffinerie de pétrole du pays (SAR) ainsi que le siège et l'usine chimique de fabrication des engrains (ICS).

II.1.3 Koungheul

C'est une ville située dans la zone centrale du Sénégal. Cette localité se situe dans la région bioclimatique soudano-guinéenne caractérisée par une période de basse température de juillet à février avec des minima thermiques de 21° à 24°C en décembre et janvier et une période de hautes températures entre mars et juin avec des maxima variant entre 31° et 45°C en avril et mai. (ANSD, 2015). Koungheul a été érigée en commune en 1990 puis en département en 2006. C'est l'un des quatre départements de la région de Kaffrine qui est une subdivision de la région de Kaolack. L'agriculture, l'élevage, le maraîchage et le commerce sont les principales ressources de Koungheul.

II.1.4 Tambacounda (Dianké Makha)

Dianké Makha est une localité du Sénégal située dans le département de Goudiry de la région de Tambacounda. Située au sud-est du Sénégal. Cette zone est située dans la région bioclimatique soudano-guinéenne caractérisée par deux grands régimes thermiques : une période de basses températures de juillet à février avec des minima thermique de 21° à 25° en décembre-janvier et une période de hautes températures entre mars et juin avec des maxima variant entre 34° et 42° en avril-mai. L'humidité relative est très élevée en hivernage où elle dépasse les 97% entre août et octobre mais avoisine les 10 % entre janvier et mars (ANSD, 2013). Dianké Makha est l'un des arrondissements du Sénégal, il a été créé par le décret du 10 juillet 2008.

Il compte quatre (4) communautés rurales :

- Dianké Makha
- Boutou coufara
- Bani Israël
- Komoti

II.1.5 Nioro (Keur Set)

Le département de Nioro du Rip est l'un des 45 départements du Sénégal et l'un des 3 départements de la région de Kaolack. Nioro est une ville du Sud-ouest du Sénégal, située à environ 60 km au sud-est de Kaolack et à 27 km de la frontière avec la Gambie. Cette ville se trouve sur la route nationale N°4 qui relie Kaolack à Ziguinchor en traversant la Gambie. Elle est le centre du bassin arachidier première culture commerciale du pays.

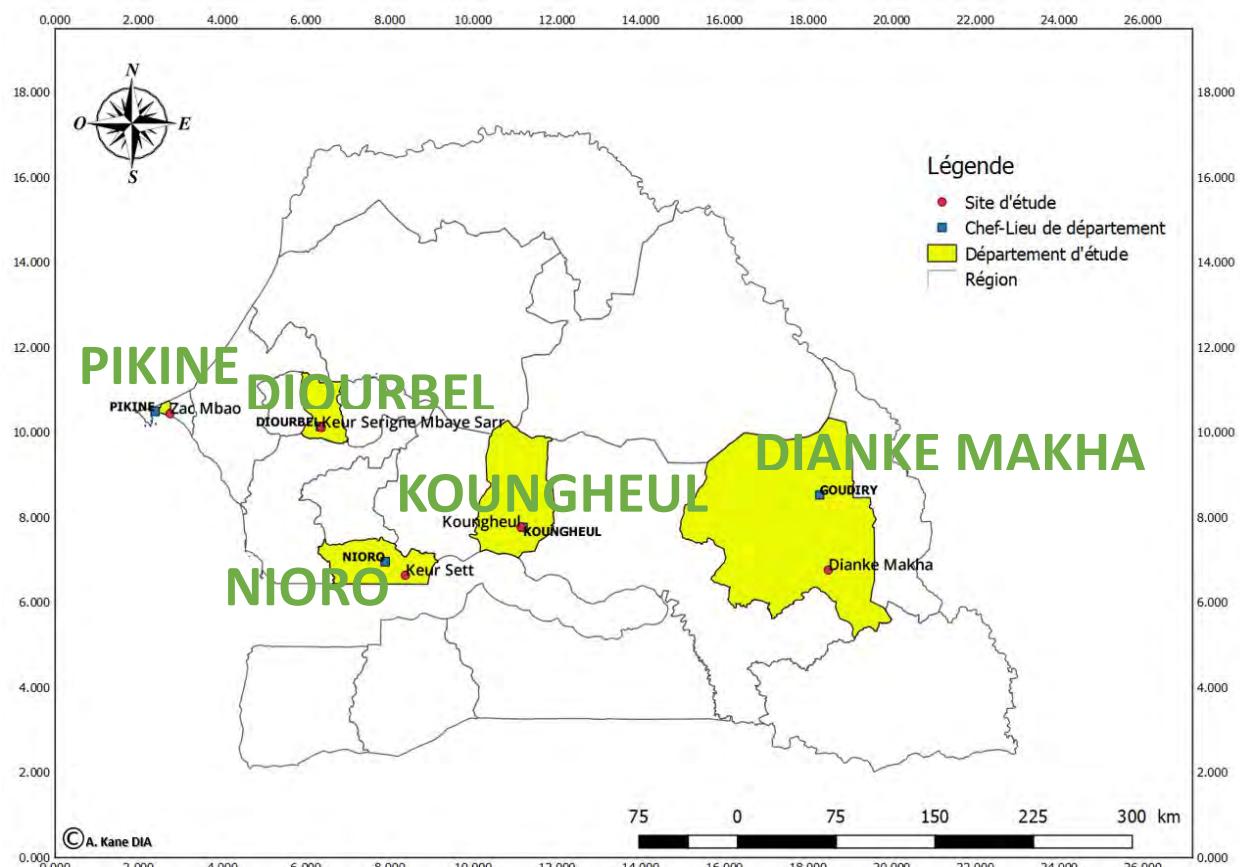


Figure 5: Localisation géographique des sites d'études

II.2 Echantillonnage et élevage des moustiques

II.2.1 Matériels de collecte des larves

Pour la prospection des gîtes et le prélèvement larvaire les matériaux utilisés sont les suivants:

- Louches,
- Bacs en plastique pour recueillir les larves récoltées,
- Pipettes Pasteur en plastique,
- Seaux avec couvercle pour les nymphes,
- Rubans adhésifs,
- Crayon et/ou marqueur,
- Une gamme de passoires à mailles fines,

- Passoires à mailles adaptées pour le filtre,
- Nourriture pour larve d'anophèle,
- Cages pour les futurs moustiques adultes,
- Serpillères, etc.

II.2.2 Prospection des gîtes et récoltes de larves

Le principe de la collecte des larves de moustiques consiste à recueillir à l'aide d'une louche ou d'un filet les stades pré-imaginaires du gîte par la méthode dite du « dipping » (OMS, 2013) et au niveau des gîtes identifiés. Les échantillons collectés ont été d'abord traités pour enlever les prédateurs, ensuite transvasés dans un seau de collecte pour être transportés au laboratoire en vue de les élever.

Au laboratoire, les larves collectées au niveau des différents gîtes ont été triées, puis réparties dans différents bacs contenant l'eau du gîte d'origine. Elles sont ainsi maintenues dans les conditions standards de température ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), d'humidité relative ($80 \pm 10\%$) et de luminosité (photo périodicité de 12 h de jours/12 h d'obscurité). Elles ont été nourries quotidiennement avec un aliment pour alevins (Mikrovit®) jusqu'au stade nymphal. Durant l'élevage, l'eau des gîtes est renouvelée tous les deux jours et progressivement remplacée après épuisement par l'eau du robinet.

II.2.3 Recueil des nymphes

Les nymphes ont été quotidiennement triées à la pipette, recueillies dans un cristallisoir à moitié rempli d'eau et placées dans une cage d'émergence. Il s'agit d'une cage cubique en fer de 17 cm d'arête, recouverte de tulle moustiquaire ouverte à l'extérieur sur l'une des faces latérales par un manchon. Cette cage qui tient lieu d'émergence des stades imaginaires, porte une étiquette avec les mentions du lieu d'échantillonnage et de la date d'émergence qui correspond au lendemain du dépôt du cristallisoir.

II.2.4 Elevage des moustiques

Les adultes ont été 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 ont été soigneusement recouvertes d'une serpillière humidifiée. Pour éviter toute fermentation, le coton imbibé de jus sucré est changé tous les 2 jours. Toutes les cages ont été placées sur des étagères et/ou tables dont les pieds ont été placés dans des bocaux remplis d'eau pour les mettre à l'abri des fourmis.



Figure 6: Collecte et élevage des larves (image A, B, C)

II.3 Détermination de la sensibilité à différentes doses de Chlorfénapyr

II.3.1 Matériels du test

Tableau 1: Le matériel de test:

Bouteilles en verre de 250 ml (Wheaton),	Pots en carton
Insecticide: Chlorfenapyr (2g de Chlorfenapyr technique, 99,9%, BASF)	Tulles moustiquaires
Balance (précision au milligramme : 0,001 g)	Cotton
Moustiques femelles âgées de 2 à 5 jours	Chronomètre
Aspirateurs à bouche	Marqueurs permanents
Acétone	Stylo et crayon
Pipettes graduées (1 ml)	Feuille de papier
Tubes Falcon 50ML	Gants en latex
Papiers aluminium	Chloroforme pour endormir les moustiques
Scotch en papier	Spatule
Serpillière	Glacière

II.3.2 Lavage et séchage des bouteilles

La manipulation a d'abord commencé par le lavage des bouteilles et des capuchons à l'eau claire. Ensuite, ces bouteilles ont été soigneusement lavées à l'intérieur avec une brosse à lavage (goupillons), en s'efforçant de bien parcourir les parois internes et externes des bouteilles; à l'aide du savon liquide et rincées à l'eau de robinet, puis à l'eau distillée. Après le lavage, elles ont été séchées à l'étuve, à une température de 60°C-75°C, pendant au moins 60 minutes. Les capuchons (en plastique) ont été également lavés de la même manière, mais leur séchage dans l'étuve exigeait une température plus basse (45°C).

Une fois bien sèches, les bouteilles sont récupérées ensuite puis l'imprégnation a été effectuée une fois qu'elles se sont refroidies. Afin de s'assurer que le lavage a été bien effectué, quelques moustiques sensibles ont été introduits dans un échantillon de bouteilles afin de s'assurer de

l'absence d'insecticide. Après la constatation de l'absence de mortalité, les bouteilles ont ensuite été imprégnées.



Figure 7: lavage des bouteilles A, séchage des bouteilles dans l'étuve (B et C)

II.3.3 Préparation des solutions de travail et conditions de conservation

- Solution Stock S1**

C'est à partir de cette solution mère (solution stock S1) qu'on obtient toutes les autres concentrations pour l'imprégnation des bouteilles. Pour l'obtenir, on ajoute 100 mg de Chlorfenapyr pur (99,9%) dans 100 ml d'acétone. Après dissolution complète après agitation, on obtient ainsi une solution stock (S1) de concentration 1 mg/ml ou 1000 μ g/ml.

Cette solution stock est ensuite couverte avec du papier aluminium et est conservée à +4°C. La bouteille est hermétiquement fermée pour éviter l'évaporation de l'acétone, à l'aide d'un marqueur on peut marquer sur la bouteille le niveau de la solution pour s'assurer de sa non évaporation. Cette solution mère peut être gardée et utilisée durant un mois.

- Solutions de Tests**

Pour l'obtention des solutions test (gamme de concentrations), on utiliser cette solution stock pour les dilutions:

- Solution A (200 μ g/ml)**

Le mélange 5ml de la solution S1 avec 20ml d'acétone, permet d'obtenir la solution test qu'on nommera solution A et qui est égale à 200 μ g/ml.

Ainsi 1ml de cette solution sera utilisé pour imprégner chacune des bouteilles à 200 μ g/ml.

- Solution B (100 μ g/ml)**

On mélange 5ml de la solution A à 5ml d'acétone pour avoir cette solution B et qui est égale à 100 μ g/ml.

1ml de cette solution permet d'imprégner chacune des bouteilles à 100 μ g/ml.

- **Solution C (50µg/ml)**

On mélange 5ml de la solution B avec 5ml d'acétone pour avoir cette solution C et qui est égale à 50µg/ml.

1ml de cette solution permet d'imprégnier chacune des bouteilles à 50µg/ml.

- **Solution D (25µg/ml)**

Le mélange 5ml de la solution C avec 5ml d'acétone, nous permet d'obtenir la solution test qu'on nommera solution D et qui est égale à 25µg/ml.

Ainsi 1ml de cette solution sera utilisé pour imprégner chacune des bouteilles à 25µg/ml.

- **Solution E (12,5µg/ml)**

De même qu'ici, on mélange 5ml de la solution D avec 5ml d'acétone pour avoir cette solution E et qui est égale à 12,5µg/ml.

1ml de cette solution permet d'imprégnier chacune des bouteilles à 12,5µg/ml.

Résumé de la préparation des solutions de travail

- Solution Stock S1 (1000µg/ml) : 100mg de chlorfénapyr dans 100mg d'acétone,
- Solutions de tests (A-E): sur le tableau ci-dessous

Tableau 1: Les différentes solutions de test

Solution de test	Type de solution et volume utilisés pour la dilution	Volume d'acétone (ml)
Solution A(200µg/ml)	5ml de S1	20
Solution B (100µg/ml)	5ml de A	5
Solution C (50µg/ml)	5ml de B	5
Solution D (25µg/ml)	5ml de C	5
Solution E(12,5µg/ml)	5ml de D	5



Figure 8: Préparation des solutions de test (A B C)

II.3.4 Imprégnation et conservation des bouteilles

Les bouteilles ont été imprégnées selon la méthode décrite par Brogdon & McAllister (1998), légèrement modifiée. Pour cela, on doit avant tout s'assurer que les bouteilles et les capuchons sont bien propres et secs. Un millilitre (1 ml) de solution d'insecticide a servi à l'imprégnation de toutes les surfaces internes de chacune des bouteilles avec une concentration donnée (200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml). Un millilitre (1 ml) d'acétone est aussi utilisé pour l'imprégnation de chacune des bouteilles témoins (contrôle).

Après imprégnation, les bouteilles ont été séchées en les roulant sur la paillasse pendant quelques minutes jusqu'à une disparition complète des traces de liquide puis utilisées ou conservés (avec leurs capuchons) dans un placard à l'abri de la lumière, pour les bio-essais ultérieurs (Figure 8). Ainsi les bouteilles imprégnées ne peuvent être utilisées que dans les 24heures suite à l'imprégnation. Au-delà des 24heures, elles doivent être reimprégnées avant une nouvelle utilisation.

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



Figure 9: Imprégnation et stockage des bouteilles imprégnées (A, B, C)

II.3.5 Tests en bouteilles CDC

Pour ce test, des adultes d'*An. gambiae s.l.* à jeun et âgés de 2 à 5 jours sont utilisés. Les moustiques à tester sont au préalable mis en observation dans des cages d'émergence afin de s'assurer de leur bon état. Ces derniers sont par la suite délicatement introduits dans les bouteilles pour être testés. Ainsi, avec deux aspirateurs (un exclusivement réservé aux moustiques témoins et l'autre pour ceux qui seront exposés à l'insecticide). En effet, pour chaque concentration (200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml), 100 à 125 spécimens ont été délicatement introduits dans cinq (5) bouteilles en raison de 20 à 25 moustiques par bouteille, toujours accompagnés d'une bouteille témoin imprégnée d'acétone contenant aussi 20 à 25 moustiques. L'ensemble est exposé pendant 60 minutes, puis les *Knock down* (moustiques assommés) ont été immédiatement enregistrés mais la température et l'humidité ont été également notées à chaque fois. Les moustiques sont par la

suite remis dans des cages bien propres (une exclusivement réservé aux moustiques témoins et les autre pour ceux qui seront exposés à l'insecticide en raison d'une case par concentration) et sont ensuite repris à l'aide des aspirateurs pour être transférés dans des pots cartonnés fermés par du tulle moustiquaire. Les moustiques sont ainsi maintenus dans ces pots durant trois (3) jours (J1, J2 et J3) d'observation avec un enregistrement quotidien de la mortalité et des conditions environnementales. Tous les pots sont bien rangés dans une glacière recouverte d'une serpillière humidifiée. Ils sont nourris de jus sucré quotidiennement changé. Toutes les concentrations (200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml) sont testées de la même manière et en même temps.

Le test de chlorfénapyr est un test très sensible à la température ainsi pendant l'observation la température est maintenue à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ et l'humidité $75\pm 20\%$. Après l'exposition et les trois (3) jours d'observation, l'enregistrement de la mortalité se fait selon les critères décrit par le protocole.

On a eu également à effectuer les tests avec kits OMS pour quelques molécules, telles que la Deltametrine (0,05%), la Permetrine (0,75%) et le Bendiocarb (0,1%). Ce test a été fait pour une éventuelle comparaison des résultats de mortalités de ces tests avec ceux issus du chlorfénapyr.



Figure 10: Test en bouteilles CDC

Figure 9: 9a) Introduction des spécimens dans les bouteilles, 9b) moustiques en exposition, 9c) transfert des moustiques vers les pots cartonnés, 9d) et 9e) moustiques en observation

II.3.5.1 Recherche d'une dose discriminante de Chlorfénapyr

On entend par dose discriminante, la quantité d'insecticide qui peut tuer ou inhiber la croissance de tous les génotypes considérés comme sensibles pendant un temps bien déterminé dit temps

diagnostique. Le chlorfénapyr appartient à la famille chimique des pyrroles et a un mode d'action totalement différent des insecticides actuels utilisés en santé publique et approuvés par l'OMS. En effet, le chlorfénapyr interfère avec la capacité de l'insecte à produire de l'énergie et les cellules cessent de fonctionner. Le chlorfénapyr induit une mortalité au bout de 72 heures post-exposition.

II.3.5.2 Critères de validation et interprétation des résultats

Les tests sont validés sans correction si la mortalité des témoins est inférieure à 3%, validés après correction des taux de mortalité par la formule d'Abbott si elle est comprise entre 3 et 10%, invalidés puis repris lorsqu'elle est supérieure à 10%.

(Nous tenons à préciser que ces critères de validité diffèrent donc de ceux des Kits OMS)

Les tests ont été interprétés 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 et dont la confirmation sera faite par des analyses complémentaires;
- Pour une mortalité inférieure à 80 % au temps diagnostique : résistance confirmée

II.3.5.3 Conservation des échantillons

A la fin de tous les tests, les spécimens exposés à l'insecticide et les témoins ont été triés en fonction de leur statut de morts ou de survivants et identifiés morphologiquement sous loupe en utilisant les clés conventionnelles (Gillies & de Meillon, 1968).

Les spécimens survivants ont été récupérés après avoir été endormis avec du chloroforme.

Ainsi, pour faciliter le décompte, les spécimens vivants ont été transférés dans un gobelet où ils sont endormis avec du chloroforme.

Tous les échantillons survivants ont été individuellement conservés dans les tubes Eppendorf. De même que trente premiers spécimens femelles mortes à l'exposition ont été également conservés individuellement dans des tubes Eppendorf, numérotés et contenant tous du dessiccateur (silicagel). Le reste des spécimens morts ont été regroupés en lots de 5. Pour les témoins seuls 10 survivants sont conservés individuellement et le reste groupé par lots de 5. Le tout a été conservé dans des boîtes de rangement portant mention des informations utiles. Une base de données Excel contenant toutes les informations (district, localité d'étude, numéro du tube, nom de la molécule testée, sexe, état, etc.) a été établie pour les traitements ultérieurs au laboratoire.

II.4 Traitement des échantillons au laboratoire

Au laboratoire, ces échantillons ont été traités pour identifier les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et rechercher des gènes de résistance *kdr* (*Knock Down Résistance*) Ouest/Est et *Ace1* par des techniques de biologie moléculaire. Ces travaux comportent trois étapes que sont :

- L'extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique), qui permet d'obtenir l'ADN des spécimens,
- l'amplification qui conduit à une multiplication de l'ADN en nombre de copies suffisamment élevées par la technique de la réaction de polymérisation en chaîne ou «Polymérase Chain Reaction» (PCR) et,
- la révélation qui se fait sous rayon ultraviolet (UV)

II.4.1 Extraction d'ADN

L'ADN d'*An. gambiae s.l.* est extrait à partir des pattes et des ailes ou du moustique entier suivant la méthode du CTAB 2%.

L'extraction (**Annexe 5**) peut être résumée en trois phases à savoir:

- Une phase mécanique qui consiste à broyer le moustique dans 200µl de CTAB 2% ;
- Une phase chimique (lyse) qui est l'incubation dans le bain marie à 56°C pendant 1 à 24 heure, et ;
- Une phase de purification et d'élution à la sortie du Bain-Marie, qui consiste à l'élimination des protéines résiduelles, à la solubilisation des lipides et enfin à la précipitation de l'ADN. La purification et la précipitation de l'ADN ont été faits successivement avec du chloroforme, de l'isopropanol et de l'alcool 70%.

Ainsi, suite à la purification, l'ADN a été élué avec 200µl d'eau ultra-pure, ensuite laissé sur la paillasse pendant une nuit puis agité au vortex et conservé à -20°C.

II.4.2 Identification par PCR des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

II.4.2.1 Amplification par PCR

Le principe de la PCR (polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) consiste à démultiplier l'ADN en un nombre de copies suffisamment élevé pour être révélé sous un rayon ultraviolet (UV). De façon plus pratique, cette méthode consiste à répéter cycliquement les phases de dénaturation correspondant à l'ouverture du double-brin d'ADN, d'hybridation ou fixation des amorces à la matrice et d'extension qui est l'ajout des bases complémentaires grâce à un thermocycleur (Mullis *et al*, 1986). Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exceptionnelle de la séquence d'ADN cible.

Ainsi, l'amplification des séquences d'intérêt est réalisée dans un volume réactionnel de 26,05µl contenant 11,1µl d'eau ultra-pure, 5µl de tampon 5x coloré, 2,5µl de dNTP, 0,3µl de MgCl₂, 1µl de chaque amorce, 0,15µl de Taq polymérase et 1µl d'extrait d'ADN. La PCR est réalisée dans les conditions suivantes: une dénaturation initiale de 5min à 95°C, suivi de 30 cycles composés chacun d'une dénaturation de 30s à 95°C, d'une hybridation des amorces de 30s à 58°C et d'une élongation de 30s à 72°C, et enfin d'une élongation finale de 5min à 72°C.

Tableau 2: Séquences des amores pour l'identification des espèces du complexe Gambiae d'après (Wilkins et al, 2006)

Amores	Séquences
IMP-UN (F, 25pmol/µl)	5'-GCTGCGAGTTGTAGAGATGCG-3'
AR-3T (R, 25pmol/µl)	5'-GTGTTAAGTGTCTTCTCCgTC-3'
GA-3T (R, 25pmol/µl)	5'-GCTTACTGGTTGGTCGGCAtGT-3'
ME-3T (R, 25pmol/µl)	5'-CAACCCACTCCCTTGACGaTG-3'
IMP-S1 (R, 25pmol/µl)	5'-CCAGACCAAGATGGT TCGcTG-3'
IMP-M1 (R, 25pmol/µl)	5'-TAGCCAGCTCTGTCCACTAGTtTT-3'

II.4.3 Electrophorèse et révélation

II.4.3.1 Electrophorèse

A l'issue de l'amplification, le résultat des PCR a été migré sur gel d'agarose à 2% (2g d'agarose + 100 ml de TBE 1X).

La préparation du gel à 2% s'est faite par rajout de 2g d'agarose à 100ml de tampon TBE 1X, mesuré respectivement à l'aide d'une balance et d'une éprouvette graduée. Le mélange mis dans un erlenmeyer en verre a été porté à ébullition au four à micro-onde pendant 5 minutes pour l'obtention d'une solution translucide. Celle-ci a été refroidie avant d'y ajouter 5µl de Biotium. Le mélange ainsi obtenu a été bien homogénéisé avant d'être coulé dans une cuve à gel contenant deux peignes préalablement placés dans la moule. Ce mélange est ensuite laissé à température ambiante pendant une heure. Après solidification, les peignes ont été enlevés et le gel a été immergé dans une cuve à migration remplie de TBE 1X.

Les produits de PCR ont été individuellement déposés dans les puits formés dans le gel, 2µl de marqueur de taille de 100pb ont été déposés dans le premier et le dernier puits. Environ 1,5µl d'amplicon du témoin négatif et du témoin positif ont été respectivement déposés dans le deuxième et le troisième puits. Le même volume des échantillons amplifiés a été déposé dans les puits restants puis le générateur réglé au préalable à 80 volts et 400 milliampères a été mise en marche pendant 90 à 120 mn.

II.4.3.2 Révélation

Les fragments d'ADN amplifiés de tailles différentes sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose avec marqueurs de taille. La révélation après la migration a été faite au niveau de la table à UV (GelDoc) relié à l'ordinateur pour l'annotation et la sauvegarde des photos. Les brins d'ADN sont visualisés par fluorescence grâce à l'ajout du GelRed (Biothium).

Ainsi, Les tailles de bandes attendues pour l'identification des espèces du complexe *An. Gambiae* sont les suivants :

- 221 pb chez *An. gambiae* ;
- 387 pb chez *An. arabiensis* ;
- 426 pb chez *An. coluzzii* ;
- 528 pb chez *An. melass* et
- 636 pb chez *An. quadriannulatus*.

Pour une éventuelle recherche des gènes kdr-e et kdr-w trois bandes d'ADN sont aussi attendues:

- la bande commune (314 pb),
- la bande susceptible (214 pb) et
- la bande résistante (156 pb).

III RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Résultats globaux

Entre septembre et décembre 2018, un total de 2 208 spécimens adultes d'*An. gambiae s.l.* issues d'un élevage à l'insectarium ont été testés. Le statut des populations d'*An. gambiae s.l.* face au chlorfénapyr a été déterminé au Sénégal dans cinq (5) districts sanitaires: Diourbel, Dianké Makha, Koungheul, Nioro, ZAC Mbao.

Tous les tests ont été faits avec les bouteilles du CDC.

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

Insecticide (Chlorfénapyr)	Localités				
	Dianké Makha	Diourbel	Koungheul	Nioro	ZAC Mbao
Taille de l'échantillon par localité	679	153	631	124	621
Total	2208				

III.1.1 Sensibilité des populations d'*An. gambiae s.l.* à la chlorfénapyr

Les femelles d'*An. gambiae s.l.* récoltées ont été exposées au chlorfénapyr par le test en bouteilles CDC, suivi d'une observation à 72h. Ainsi, les résultats des tests ont montré une sensibilité à la chlorfénapyr des populations dans toutes les localités. Cependant cette sensibilité diffère en fonction de la concentration de l'insecticide, de la durée d'exposition et de la localité. Les résultats ont été ainsi validés par ceux obtenus avec les bouteilles témoins. La mortalité dans les bouteilles témoins ayant été toujours inférieure à 3%, une correction par la formule d'Abbott n'a pas été effectuée. Les données des bio-essais ont été saisies sur des fiches d'enregistrement dont un exemplaire est présenté en ([annexe3](#))

Ce tableau ([tableau 4](#)), regroupe l'ensemble des doses avec lesquelles on a une sensibilité des spécimens selon les critères de l'OMS.

Tableau 4: résultats de la sensibilité au Chlorfénapyr selon les localités

Localité	Concentration	résultats	Temps
ZAC Mbao	200 µg/ml/bottle	98,2%	72H
Koungheul	50 µg/ml/bottle	98,98%	72H
	100 µg/ml/bottle	100%	72H
	200 µg/ml/bottle	98,08%	24H
	200 µg/ml/bottle	100%	48H
	200 µg/ml/bottle	100%	72H
Diourbel	100 µg/ml/bottle	98,40%	24H
	100 µg/ml/bottle	100%	48H
	100 µg/ml/bottle	100%	72H
Dianké Makha	200 µg/ml/bottle	98,20%	48H
	200 µg/ml/bottle	100%	72H
Nioro	100 µg/ml/bottle	98,40%	48H
	100 µg/ml/bottle	100%	72H

III.1.1.1 Dianké Makha

Les taux de mortalité post exposition au chlorfénapyr ont été 98,20% et 100% respectivement à 48H et 72H d'observation pour la concentration de 200µg/ml. En tenant en compte des critères de validation, ces résultats indiquent une sensibilité d'*An. gambiae s.l.* à la chlorfénapyr dans cette localité.

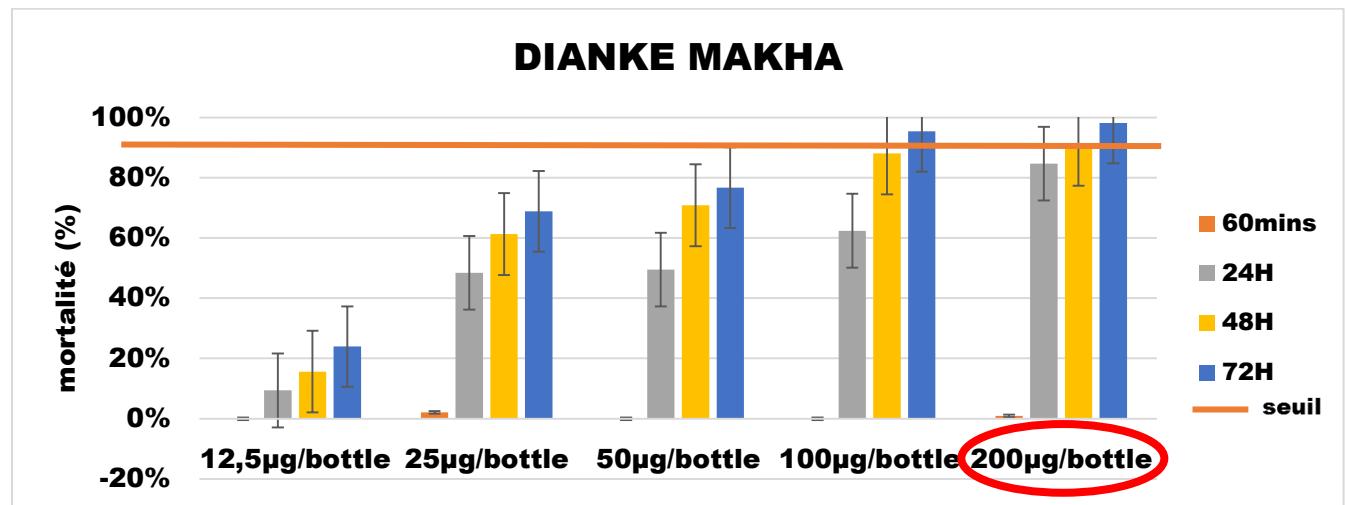


Figure 11: Taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* suite à l'exposition au chlorfénapyr à Dianké Makha

III.1.1.2 Diourbel (Keur Serigne Mbaye Sarr)

Pour cette localité, la faiblesse de la taille de l'échantillon a conduit à ne tester que la concentration (100µg/ml) et le résultat montre une sensibilité d'*An. gambiae s.l.* avec un taux de mortalité de 98,40% à 24H d'observation et 100% à 48H.

III.1.1.3 Nioro (Keur Set)

Pour cette localité aussi, la faiblesse de la taille de l'échantillon a mené à ne tester que la concentration (100µg/ml) et le résultat indique une sensibilité d'*An. gambiae* s.l. avec un taux de mortalité de 98,13% à 48H d'observation et 100% à 72H.

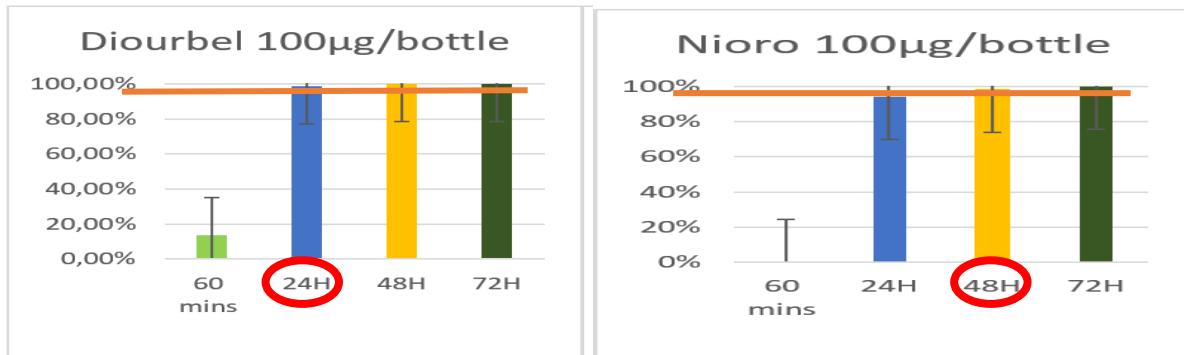


Figure 12: Taux de mortalité d'*An. gambiae* s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr respectivement à Diourbel et à Nioro

III.1.1.4 Koungheul

Les taux de mortalité post exposition au chlorfénapyr ont été 98,98% à 72H pour la concentration de 50µg/ml. En tenant compte des critères de validation, ces résultats indiquent une sensibilité d'*An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr.

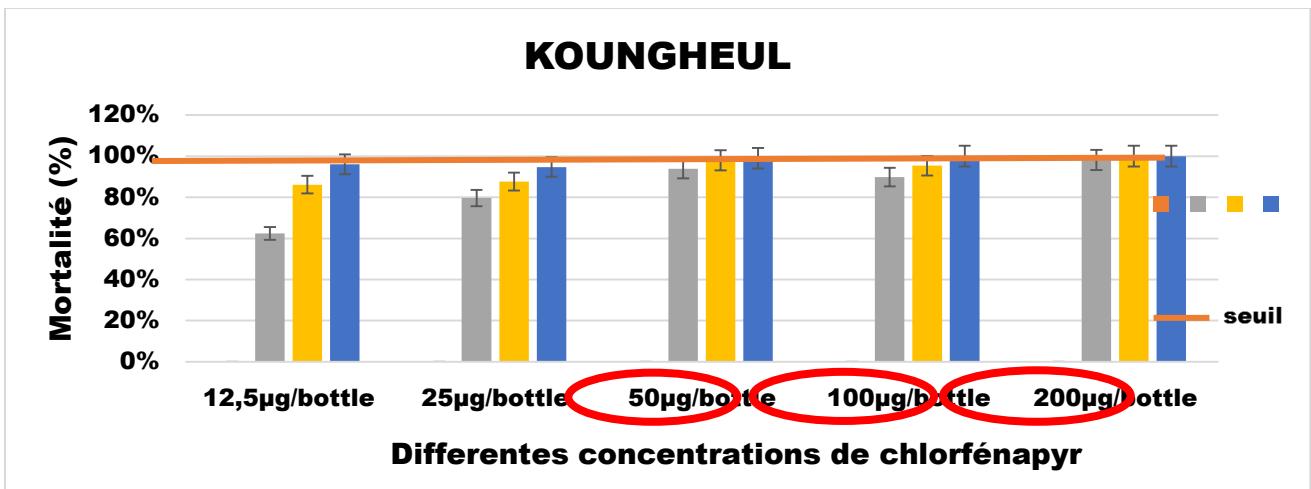


Figure 13: Taux de mortalité d'*An. gambiae* s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr à Koungheul

III.1.1.5 ZAC Mbao

Les taux de mortalité post exposition au chlorfénapyr ont été 98,2% à 72H pour la concentration de 200µg/ml. En tenant compte des critères de validation, ces résultats indiquent une sensibilité d'*An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr dans cette localité.

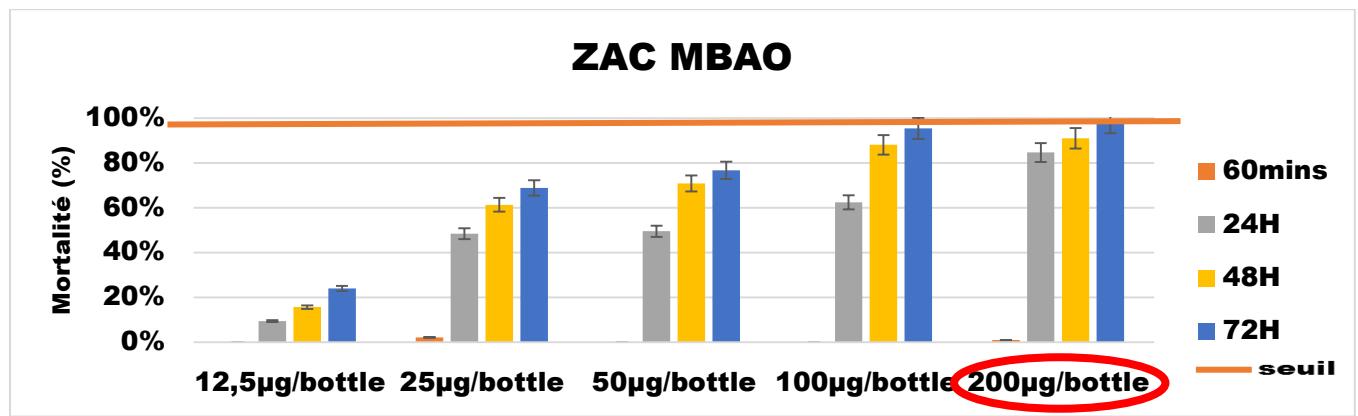


Figure 14: Taux de mortalité d'*An. gambiae* s.l. suite à l'exposition au chlorfénapyr à ZAC Mbao

Les taux de mortalité post exposition à la chlorfénapyr ont montré une sensibilité à l'insecticide d'*An. gambiae* s.l avant même la fin de la période d'observation. Dans l'ensemble, les résultats obtenus indiquent une sensibilité d'*An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr.

III.1.2 Comparaison des résultats de mortalité du chlorfénapyr aux autres molécules testées

Localités	Chlorfénapyr	Deltametrine 0,05%	Permetrine 0,75%	Bendiocarb 0,1%
ZAC Mbao	98,2%(200µg/bottle)	20%	20%	97%
Diourbel	100%(100µg/bottle)	53%	10%	85,20%
Koungheul	100%(100µg/bottle)	72,80%	62%	99%
Nioro	100%(100µg/bottle)	77%	90%	85%

Tableau 5: Statut de la sensibilité des populations d'*An. gambiae* s.l. selon la molécule et la localité

L'observation de ces résultats avec les tests issus de différents sites de Diourbel, Koungheul, Nioro, ZAC Mbao montre une résistance d'*An. gambiae* s.l. pour la deltametrine et la permetrine également pour le bendiocarb excepté Koungheul alors que les résultats des tests du chlorfénapyr indiquent une sensibilité des populations à cet insecticide dans ces districts.

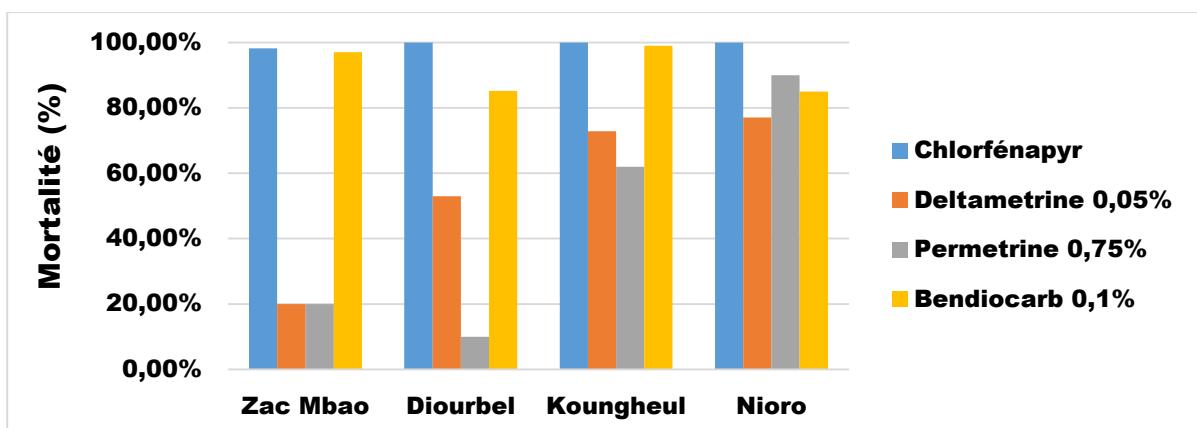


Figure 15: Statut de la sensibilité des populations d'*An. gambiae* s.l. selon la molécule et la localité

III.1.3 Identification spécifique des espèces du complexe *An. gambiae* s.l. selon le district

L'identification par PCR des espèces du complexe d'*An. gambiae* s.l. portant sur un échantillon de 454 spécimens a révélé une présence d'*An. arabiensis*, d'*An. gambiae* et d'*An. coluzzii* dans notre site d'étude.

Tableau 6: Distribution des espèces d'*An. gambiae* s.l. dans les localités étudiées

Districts	Espèces			
	<i>An. arabiensis</i> (%)	<i>An.coluzzii</i> (%)	<i>An.gambiae</i> (%)	Total (%)
Dianké Makha	16,6	3,2	80,2	96 (100)
Diourbel	100	0	0	81 (100)
Koungheul	100	0	0	87 (100)
Nioro	88,7	9,2	2,1	97 (100)
Zac Mbao	100	0	0	93(100)

III.2 Discussion

Au cours de notre étude, 3 espèces du complexe *An. gambiae* ont été collectées, à savoir *An. arabiensis*, *An. gambiae* s.s. et *An. Coluzzii*.

An. arabiensis a été l'espèce majoritaire dans nos sites d'étude. Ainsi, pour la localité de ZAC Mbao qui fait partie de la région de Dakar c'était la seule espèce présente de même que Diourbel et Koungheul, ces résultats corroborent davantage les données d'études entomologiques réalisées dans cette région (Vercruyse & Jancloes, 1981 ; Trape *et al.*, 1992 ; Diallo *et al.*, 2000; Pagès *et al.*, 2008 ; Thiaw, 2014;). *An. arabiensis* constitut aussi l'espèce prédominante à NIORO. la région Dakaroise présente la même composition de la faune anophélienne depuis bien des décennies, caractérisée par la présence exclusive d'*An. arabiensis*. Cela pourrait s'expliquer par la présence de ses gîtes préférentiels, notamment leur niveau de salinité qui les rendrait plus propices au développement de ses larves (Diagne *et al.*, 1994). La région de Diourbel à l'image des zones soudano-sahéliennes présente également un climat propice au développement d'*An arabiensis*; en effet elle est caractérisée par un climat chaud et sec, une saison pluvieuse de 1 à 3 mois et une moyenne pluviométrique de 400 mm (Faye *et al.*, 2011).

De façon générale, La domination d'*An. arabiensis* dans les échantillons analysés est liée d'une part à sa meilleure adaptation aux zones arides et d'autre part à la présence des conditions bioécologiques adaptées à sa pullulation. Cela corrobore davantage les résultats d'études réalisées au Sénégal et un peu partout en Afrique (Mouchet *et al.*, 1993) où l'espèce était majoritairement ou exclusivement représentée. La prédominance d'*An. gambiae* dans les échantillons analysés dans les districts de Dianké Makha justifie la meilleure adaptation de celle-ci aux zones humides (Della Torre *et al.*, 2005 ; Niang *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2008). Les faibles proportions d'*An. coluzzii* parmi les échantillons analysés corroborent les observations sur la distribution des espèces du complexe *An. gambiae*. En effet, cette espèce trouvée généralement dans les environnements secs présente une distribution plus septentrionale (Niang *et a.l*, 2014 ; Lehmann *et al.*, 2008).

Étant donné le nombre limité d'insecticides disponibles pour la santé publique, il a été urgent d'évaluer d'autres produits chimiques avec de nouveaux modes d'action pour améliorer la lutte anti vectorielle (LAV) et même le contrôle des populations de vecteurs résistants (Hemingway *et al.*, 2006). Cette étude a permis de déterminer la dose diagnostique du **chlorfénapyr** (pyrrole) pour *Anopheles gambiae* s.l. dans une perspective de lutte antivectorielle intégrée au Sénégal.

La dose diagnostique étant définie comme la dose d'insecticide qui tue 100% des moustiques sensibles dans un délai défini varie en fonction des districts: Pour Zac Mbao et Dianké Makha, elle

est de 200 µg / bouteille à 72H d'observation. Pour Koungheul et Nioro, la dose diagnostique est 100 µg / bouteille pour une observation de 72H alors qu'elle est aussi de 100 µg / bouteille à Nioro pour une observation de 72H.

Les résultats de notre étude ont révélé une sensibilité des populations d'*An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr, quel que soit le district.

En effet, à l'issus du test de l'ensemble des concentrations (200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml), la dose efficace du Chlorfenapyr (Pyrolle) pour le contrôle des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. au Sénégal, que nous proposons serait la dose 200 µg/ml. Les résultats ainsi obtenus, concordent avec ceux obtenus dans d'autres pays d'Afrique ou de la sous-région comme l'Ethiopie, le Bénin et même en Tanzanie. Car une étude de sensibilité de 19 pesticides testés contre des colonies d'insectes d'*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles quadrimaculatus* a indiqué que le chlorfénapyr était le plus efficace contre *An. quadrimaculatus* et moins contre *Culex quinquefasciatus* (Pridgeon *et al.*, 2008); d'autres tests de toxicité ont rapporté que le chlorfénapyr peut avoir un effet létal contre les populations de terrain de cette dernière espèce (Shah *et al.*, 2016). De plus, plusieurs essais en Tanzanie et au Bénin ont mis en évidence l'efficacité du chlorfénapyr en complément des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes contre *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae sensu stricto* (ss) et *Culex quinquefasciatus* (Mosha *et al.*, 2008 ; N'Guessan *et al.*, 2007) et comme candidat à l'Aspersion Intra-domiciliaire (AID) au Bénin (Oxborough *et al.*, 2010 ; Ngufor *et al.*, 2016). Par ailleurs, le chlorfénapyr est l'un des deux ingrédients actifs d'une combinaison des MILDA avec de l'alpha-cyperméthrine, produite par BASF (Interceptor® G2), qui a reçu l'approbation provisoire de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017 (WHO(a), 2017). Il est également en cours d'évaluation en tant que produit AID (Sylando® 240SC) (WHO(b), 2017).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la lutte contre les vecteurs du paludisme, les interventions basées sur les insecticides jouent un rôle essentiel. Toutefois, la propagation continue de la résistance aux insecticides menace de compromettre les progrès réalisés à ce jour et peut finalement conduire à l'échec opérationnel des mesures de contrôle actuelles.

Le chlorfénapyr ayant un mode d'action unique est un candidat potentiel à l'inclusion dans les efforts de lutte antivectorielle. Notre étude a permis d'évaluer le statut de la sensibilité des vecteurs du paludisme à un insecticide nouvel au Sénégal. Les moustiques ont été généralement sensibles au Chlorfénapyr dans les zones testées où la résistance aux molécules standards a été notée.

Nos résultats ont également confirmé la présence exclusive d'*An. arabiensis* à Dakar et Diourbel aussi sa prédominance dans le reste de notre zone d'étude. A ce jour, le chlorfénapyr avec ces résultats prometteurs est un alternatif dans nos programmes nationaux de lutte contre le paludisme car la résistance aux insecticides couramment utilisés reste un problème majeur de santé publique.

Le Chlorfénapyr pourrait aider le PNLP et d'autres parties prenantes à faire des choix éclairés concernant les outils les plus appropriés pour la lutte contre les vecteurs du paludisme et la gestion de la résistance aux insecticides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 **Anon, 1995.** insecticide-miticide, American Cyanamid Company. Pages 1-20.
- 2 **Black, B.C., Hollingsworth, R.M., Ahammadahib, K.I., Kukel, C.D. & Donovan, S. 1994.** Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles. Pesticide biochemistry and physiology, 50: 115-128.
- 3 **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.
- 4 **Carnevale & Robert, 2009.** Les anophèles Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle
- 5 **Collins F. H. & Paskewitz S. M. 1996.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. Insect Molecular Biology, 5(1), 1-9.
- 6 **Crawford J. E., Rottschaefer S. M., Coulibaly B., Sacko M., Niaré O., Riehle M. M., Traore S. F., Vernick K. D., & Lazzaro B. P. 2013.** No evidence for positive selection at two potential targets for malaria transmission-blocking vaccines in *Anopheles gambiae* s.s. Infect Genet Evol, 16: 87–92.
- 7 **Che W, Shi T, Wu Y et Yang Y.2013.** État de la résistance aux insecticides des populations de champ de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) de Chine. J Econ Entomol. 106: 1855–1862.
- 8 **Dia, I., Diop T., Rakotoarivony I., Kengne P. & Fontenille D., 2003.** Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) and transmission of Plasmodium falciparum in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Sénégal). J. Med. Entomol. 40(3): 279-283.
- 9 **Dia I., Diallo D., Duchemin J.B., Ba Y/ ; Konate L., Costantini C. & Diallo M. 2005.** Comparisons of human-landing catches and odor-baited entry traps for sampling malaria vectors in Senegal. J. Med. Entomol. 42 (2), 104-109.
- 10 **Dia I., Konate L., Samb B., Sarr J.B., Diop A., Rogerie F., Faye M., Riveau G., Remoue F., Diallo M. & Fontenille D. 2008.** Prevalence of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. Acta Tropica 105: 145-153.
- 11 **Diagne, N., Fontenille, D., Konaté, L., Faye, O., Lamizana, M. T., Legros, F., Molez, J. F. & Trape, J. f ., 1994.** Les anophèles du Sénégal : Liste commentée et illustrée. bulletin de la société de pathologie exotique, pp.267–277.

- 12 **Diop A., Molez J.F., Konate 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.
- 13 **Djogbénou L. 2009.** La lutte antivectorielle et la résistance des vecteurs aux insecticides en Afrique. Médecine Tropicale, 69 : 160-164.
- 14 **Faye O., Gaye O., Fontenille D., Hébrard G., Konaté L. et al. 1995.** La sécheresse et la baisse du paludisme dans les Niayes du Sénégal. Cahiers Santé. 5 : 299-305.
- 15 **Faye, O., Fontenille D., Gaye, O., Sy, N., Molez, J.F., Konate, L., Hebrard, G., Herve, J.P., Trouillet, J., Diallo, S., Mouchet, J., 1995.** Paludisme et riziculture dans le Delta du fleuve Sénégal. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 75, 179-189.
- 16 **Faye, O., Konaté, L. and Diop, A. (2011).** Profil entomologique du paludisme au Sénégal.41p.
- 17 **Fontenille D., Lochouarn L., Diagne N., Sokhna S., Lemasson J.J., Diatta M., Konate L., Faye F., Rogier C. & Trape J.F., 1997.** High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56(3): 247-253.
- 18 **Gérard M.1993.** Paludisme: un vaccin qui surprend. Science et Vie 908, p. 29-30.
- 19 **Gillies M.T. 1953 –** The duration of gonotrophic cycle in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* with a note on the efficiency of hand catching. East African Medical Journal, 30: 129-135.
- 20 **Gillies M. T., & de Meillon B. 1968.** The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethopian Zoogeographical Region). Johannesburg: Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. ; p. 343.
- 21 **Gunning RV, Moores GD. Résistance au chlorfénapyr chez Helicoverpa armigera en Australie.2002.** Dans: Actes sur les parasites et les maladies de la conférence du conseil britannique de la protection des cultures. Londres, Royaume-Uni: British Crop Protection Council; p. 793–8.
- 22 **Hemingway J, Beaty BJ, Rowland M, Scott TW, Sharp BL.** The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. Trends Parasitol. 2006;22:308–12.
- 23 **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.
- 24 **JETTENT.H., MARTENS W.J., TAKKEN W., 1996 –** Model simulations to estimate malaria risk under climate change. J. Med. Ent., 33 : 361-371.

- 25 **Kabula B., Kisinja W., Tungu P., Ndege C., Batengana B., Kollo D., Malima R. et al. 2014.** Co-occurrence and distribution of East (L1014S) and West (L1014F) African knock-down resistance in *Anopheles gambiae sensu lato* population of Tanzania. Tropical Medicine and International Health, 00(00).
- 26 **Kamaraju Raghavendra, Tapan K Barik1, Poonam Sharma, Rajendra M Bhatt, Harish C Srivastava, Uragayala Sreehari1, Aditya P Dash1.2011 – Chlorfenapyr:** a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors.
- 27 **Knight K.L. & Stone A. 1977.** A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera : Culicidae). Thomas Say Foundation, Washington, 611 p.
- 28 **Lemasson, J.J., Fontenille, D., Lochouarn, L., Dia, I., Simard, F., Ba, K., Diop, A., Diatta, M., Molez, J.F., 1997.** Comparison of behavior and vector competence of *A. gambiae* and *A. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a sahelian area of Senegal. J. Med. Entomol. 40 (34), 396–403.
- 29 **Lindsay S.W., Birley M.H., 1996 – Climate change and malaria transmission.** Ann. Trop. Med. Parasitol., 90 (6) : 573-588.
- 30 **Lovell JB, Wright DE, Gard IE, Miller TE, Treacy ME, Addor RW, Kamhi VM:** An insecticide/acaricide from a novel class of chemistry. Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases, British Crop. 1990, Protection Council, Croyden, UK. 2/3, 37-42,
- 31 **Loevinsohn M.E., 1994 – Climatic warming and increased malaria incidence in Rwanda.** Lancet, 343 : 714-718.
- 32 **Martens P., 1999 – Miasma:** Modelling framework for the health impact assessment of man-induced atmospheric changes. ESIAM, CDRom n° 2.
- 33 **Mouchet J., Manguin S., 1999 – Le réchauffement de la planète et l'expansion du paludisme.** Ann. Soc. Entomol. Fr., 35 : 549-555
- 34 **Mullis, K., Falloona F., Scharf, S., Saiki R., Horn, G., & Erlich, H. 1986.** Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 51: 263-273.
- 35 **Mosha FW, Lyimo IN, Oxborough RM, Malima R, Tenu F, Matowo J, et al. Experimental hut evaluation of the pyrrole insecticide CHLORFENAPYR on bed nets for the control of *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus*.** Trop Med Int Health. 2008;13:644–52. **N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Yates A, Rowland M.** Chlorfenapyr: a pyrrole insecticide for the control of pyrethroid or DDT resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 2007;102:69–78.

- 36 **N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Knols B, Akogbeto M, Rowland M.** 2009. Contrôle des moustiques *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus* résistants aux pyréthroïdes au Bénin. *Trop Med Int Santé*. 14: 389–95.
- 37 **Ngufor C, Critchley J, Fagbohoun J, N'Guessan R, Todjinou D, Rowland M, et al.** CHLORFENAPYR (a pyrrole insecticide) applied alone or as a mixture with alpha-cypermethrin for indoor residual spraying against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* s.l.: an experimental hut study in Cove, Benin. *PLoS ONE*. 2016;11:e0162210.
- 38 **Oliver SV, ML Kaiser, OR en bois, Coetzee M, Rowland M, Brooke BD.** 2010. Evaluation de l'insecticide pyrrole CHLORFENAPYR contre *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) résistants et sensibles aux pyréthroïdes. *Trop Med Int Santé*; 15: 127–31.
- 39 **OMS. 1998.** World Malaria Report
- 40 **OMS. 2007.** World Malaria Report
- 41 **OMS. 2012.** Plan Mondial pour la gestion de la résistance chez les vecteurs du paludisme : résumé d'orientation.
- 42 **OMS. 2012.** World Malaria Report
- 43 **OMS. 2014.** World Malaria Report
- 44 **OMS (2015).** Paludisme : projet de stratégie technique mondiale pour l'après-2015.
- 45 **OMS. 2018.** Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme – seconde édition
- 46 **OMS. 2018.** World Malaria Report
- 47 **Oxborough RM, Kitau J, Matowo J, Mndeme R, Feston E, Boko P, et al.** Evaluation of indoor residual spraying with the pyrrole insecticide CHLORFENAPYR against pyrethroid-susceptible *Anopheles arabiensis* and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104:639–45.
- 48 **Pages, F., Orlandipradines, E., and Corbel, V. (2007).** Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine Mal. Infect*. 37, 153–161.
- 49 **Pagès, F., Texier, G., Pradines, B., Gadiaga, L., Machault, V., Jarjaval, F., Penhoat, K., Berger, F., Trape, F., Rogier, C. & Sokhna, C., 2008.** Malaria transmission in Dakar : A twoyear survey. *Malaria Journal*, 11, pp.1–11.
- 50 **Pascual M., Ahumada J.A., Chaves L.F., Rodo X., Bouma M., 2006** – Malaria resurgence in the East African highlands : temperature trends revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 5829-5834.
- 51 **Patz J.A., Olson S.H., 2006** – Malaria risk and temperature : influences from global climate change and local land use practices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 5635-5636.

- 52 **Petrarca, V., Vercruyse, V., Coluzzi, M., 1987.** Observations on the Anopheles gambiae complex in the Senegal River Basin, West Africa. Med. Vet. Entomol. 1, 303–312.
- 53 **Pimprale SS, Besco CL, Bryson EK, Brown TM:** Increased susceptibility of pyrethroid-resistant tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to CHLORFENAPYR. J Econ Entomol. 1997, 90: 49-54,
- 54 **PNLP (2015).** Plan stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Sénégal 2016 - 2020 (Sénégal).
- 55 **Pridgeon JW, Pereira RM, Becnel JJ, Allan SA, Clark GG, Linthicum KJ.** Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. J Med Entomol. 2008;45:82–7.
- 56 **Ranson H., Jensen B., Vulule J. M., Wang X., Hemingway J., and Collins F. H. 2000.** Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Molecular Biology, 9(5), 491–497.
- 57 **Raghavendra K, Barik TK, Sharma P, Bhatt RM, Srivastava HC, Sreehari U, et al.** Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. Mal. J. 2011;10:16.
- 58 **Robert V., Dieng H., Locheurn L., Traore S.F., Trape J.F., Simondon F. & Fontenille D. 1998** - La transmission du paludisme dans la zone de Niakhar, Sénégal. Trop. Med. Int. Health 3(8): 667-677.
- 59 **Ross R. 1897.** On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. Brit. Med. J., 18: 1786-1788.
- 60 **Romero A, MF Potter, KF Haynes.2010.** Évaluation du CHLORFENAPYR pour le contrôle de la punaise de lit, *Cimex lectularius* L. Pest Manag Sci. 66: 1243–8.
- 61 **Rueda L.M., Patel K.J., Axtell R.C. & Stinner RE., 1990.** Temperature-dependent development and survival ratesof *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol., 1990, 27: 892-898.
- 62 **Riehle M. M., Xu J., Lazzaro B. P., Rottschaefer S. M., Coulibaly B., Sacko M., Niare O., Morlais I., Traore S. F., & Vernick K. D. 2008.** *Anopheles gambiae* APL1 is a Family of Variable LRR Proteins Required for Rel1-Mediated Protection from the Malaria Parasite, *Plasmodium berghei*. PLoS ONE, 3(11): e3672.

- 63 **Shah RM, Alam M, Ahmad D, Waqas M, Ali Q, Binyamin M, et al.** Toxicity of 25 synthetic insecticides to the field population of *Culex quinquefasciatus* Say. Parasitol Res. 2016;115:4345–51.
- 64 **Sheppard DC, Joyce JA:** Increased susceptibility of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae) to CHLORFENAPYR. J Econ Entomol. 1998, 91: 398-400,
- 65 **Sy M D, Diagne M, Dia I, Niang E H. A, Senghor M W., Konaté A, Faye M N., Konate L, & Faye O. 2015.** Evaluation de l'efficacité entomologique de l'aspersion intra domiciliaire d'insecticide (AID) au Sénégal : Campagne 2014. 1 Résultats du suivi de la saison des pluies. Rapport LEVP / PNLP – PMI, 59 p.
- 66 **Tawatsin A, U Thavara, J Chompoosri, Y Phusup, N Jonjang, C Khumsawads, et al., 2011.** Résistance aux insecticides chez les punaises de lit en Thaïlande et évaluation en laboratoire d'insecticides pour lutter contre *Cimex hemipterus* et *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). J Med Entomol. ; 48: 1023–30.
- 67 **Thiaw O. 2014.** 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. Mémoire de Master Entomologie, UCAD, n°198 , 17-18p.
- 68 **Thomson M.C., Doblas-Reyes F.J., Mason S.J., Hagedorn R., Connor S.J., Phindela T., Morse A.P., Palmert.N., 2006** – Malaria early warnings based on seasonal climate forecasts from multi-model ensembles. Nature, 439 : 576-579.
- 69 **Tomlin CDS: A World Compendium. The Pesticide Manual.** Edited by: 12th. 2000, British Crop Protection Council, London,
- 70 **Trape, J. f., Lefebvre-Zante, E., Legros, F., Ndiaye, G., Bouganali, H., Druilhe, P. & Salem, G., 1992.** Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Sénégal. Trop. Med. Hyg, 47(2), pp.181–189.
- 71 **Vercruyse, J., 1985.** Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans la bassin du fleuve Senegal (Senegal). Ann. Soc. Belge Med. Trop. 65 (Suppl. 2), 171–179.
- 72 **Vercruyse J. & Jancloes M., 1981** - Étude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans la zone urbaine de Pikine (Sénégal). Cah. ORSTOM ser. Entomol. Parasitol. 19, 165-178.
- 73 **WHO, 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

- 74 **WHO (a).** Recommended long-lasting insecticidal nets. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 1–2.
- 75 **WHO (b).** WHO prequalifies indoor residual spray for vector control. Geneva: World Health Organization; 2017.
- 76 **WHO, 2013.** Malaria entomology and vector control: guide for participants.
- 77 **Wilkins, E., Howell, P. & Benedict, M., 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*, 7, pp.1–7

ANNEXES

Annexe 1

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

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 ¾ 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) Ensuite, 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, avec 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 2

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

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;
- 4) Ajouter 1 ml d'insecticide à la dose diagnostique dans chacune des 5 bouteilles de test qui seront bien fermées avec leurs capuchons respectifs ensuite bien numérotés;
- 5) Agiter légèrement la bouteille, 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 et pour toutes les concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200µg). 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.

Annexe 3

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

Fiche de test de bio-essais avec la bouteille du CDC

FICHE D'ENREGISTREMENT DE TEST EN BOUTEILLES CDC_CHLORFENAPYR

1	Pays _____ Région _____ District _____ Localité _____										
2	Coordonnées GPS : Latitude (N <input type="checkbox"/> / S <input type="checkbox"/>): _____ ° _____ ' _____ " Longitude (O <input type="checkbox"/> / E <input type="checkbox"/>): _____ ° _____ ' _____ "										
3	Méthode de collecte : _____ Espèce : _____ Age (jours) : _____										
4	Insecticide testé : _____ Concentration : _____ Condition de stockage _____										
5	Temperature (°C) Période d'exposition : Max _____ Min _____ Période d'observation : Max _____ Min _____										
6	Humidité relative (%) : Période d'exposition _____ Période d'obseravtion _____										
7	Résultats										
Description		Bouteille 1	Bouteille 2	Bouteille 3	Bouteille 4	Bouteille 5	Total Bouteilles	Témoin	Conditions du test		
									Temp. (°C)	HR (%)	
									Min	Max	
Nombre de moustiques testés											
Nombre de moustiques "knock down" à 60 min											
Nombre de moustiques morts pendant l'observation											
24h											
48h											
72h											
Mortalité observée après 72 heures (%)											
Mortalité corrigée (%)											
Notes :											

Annexe 4

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

Protocole du bio-essai avec la bouteille du CDC

A. Matériels et réactifs

- Des bouteilles de 250 ml, en verre et déjà imprégnées de chlorfénapyr et couvertes par leurs capuchons. Pour chaque test, il faut au total 6 bouteilles par concentration (les 5 imprégnées avec le chlorfénapyr et celle servant de témoin et qui est donc imprégnée avec de l’acétone) ;
- Les différentes concentrations pour l’imprégnation sont 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g chlorfénapyr
- Des aspirateurs pour prélever les moustiques;
- Des cages d’émergence pour contenir les populations de moustiques à tester ;
- Des pots cartonnés pour le transfert des moustiques ;
- Des fiches et des crayons, pour l’enregistrement des données ;
- Des pinces souples pour saisir les moustiques.

B. Mode opératoire

- Charger d’abord les aspirateurs (celui réservé à la bouteille témoin et les 5 autres attribués aux bouteilles de test) et boucher leur ouverture avec du coton. Le nombre de moustiques dans chaque aspirateur varie de 20 à 25;
- Placer ces aspirateurs au voisinage des bouteilles imprégnées pendant quelques minutes ;
- Transférer ces moustiques contenus dans chacun des aspirateurs dans les bouteilles. Ce transfert des moustiques dans les bouteilles imprégnées doit se faire assez rapidement et avec beaucoup de soins; démarrer le minuteur (pour 60 minutes d’exposition) aussitôt la dernière bouteille chargée, et commencer aussitôt l’enregistrement de la mortalité à un temps t=0;
- Enregistrer les Knock-down dans les bouteilles à 60 minutes, puis transférer les moustiques dans les pots cartonnés pour ensuite enregistrer la mortalité les 24, 48 et 72H d’observation
- Enregistrer tous les données sur la fiche.

Les conditions de tests : Température : 27-29°C et Humidité Relative : RH 75% (plus ou moins 20)

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

Protocole d'extraction d'ADN au CTAB 2%, à partir de moustiques (sans protéinase K)

1. Objectifs

- Standardiser la méthode
- Avoir des ADN de qualité pour une bonne PCR.

2. Champ d'application

UMR 198 URMITE, pôle MIE

3. Mode opératoire

- Broyer chaque échantillon (moustique entier ou pattes ou ailes, etc.) dans 200µl de CTAB à 2%,
- Mettre au Bain-Marie 56°C pour une durée d'une à 24 heures
- Ajouter 200µl de chloroforme
- Mélanger par inversion,
- Centrifuger 5 minutes à 12000trs/mn,
- Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube,
- Ajouter 200µl d'isopropanol dans le surnageant
- Bien mélanger par inversion,
- Centrifuger 15 minutes à 12000trs/mn,
- Vider l'isopropanol, bien égoutter et ajouter 200µl d'éthanol 70%,
- Centrifuger à 5 minutes à 12000trs/mn,
- Vider l'éthanol,
- Sécher le culot 5 minutes maximum au Speed-Vac™,
- Reprendre le culot dans 200µl de tampon d'élution,
- Laisser sur le paillage pendant toute la nuit ou pendant une demi-journée
- stocker l'extrait d'ADN à T -20°C

Annexe 6

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

Protocole d'identification par PCR des espèces du complexe *An. gambiae*

Témoin -:	<i>An. gambiae</i> M
Témoin + :	Eau pure

Réactifs	Solution mère	volumé (μ l) / 1 tube	Nombre tubes (n=)	volumé MIX en μ l pour n tube
Eau		11,1	25	277,5
Temps	5X	5	25	125
dNTP	2,5 mM	1,5	25	62,5
MgCl ₂	25mM	0,3	25	7,5
IMP-UN	0,25pmol/ μ l	1	25	25
AR-3T	0,25pmol/ μ l	1	25	25
GA-3T	0,25pmol/ μ l	1	25	25
ME-3T	0,25pmol/ μ l	1	25	25
IMP-SI	0,25pmol/ μ l	1	25	25
IMP-MI	0,25pmol/ μ l	1	25	25
Go Taq		0,15	25	3,75
total MIX		25,05		625,25

ADN par tube (1,5ug/ μ l=ADN extrait dilué au 1/15): 1 μ l

CONDITIONS DE PCR ID

Programme		
	T°C	temps
Etape		
Dénaturation initiale	95	5 min
Dénaturation	95	30 sec
Hybridation	58	30 sec
Étiquetage	72	30 sec
Nombre de cycle	30	
Étension finale	72	5 min

Tailles fragments ADN attendues	
<i>An. quadriannulatus</i>	636 pb
<i>An. strobli</i>	528 pb
<i>An. gambiae</i>	463 pb
<i>An. arabiensis</i>	397 pb
Forme Mopti	426 pb
Forme Savana	271 pb

Ref: Wilkins et al (2006)

Annexe 7

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Animale

Laboratoire Écologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

Protocole de migration

Préparation de gel 1.5% ou 2%

- Peser 1.5 g ou 2g d'agarose pour 100 ml de tampon TBE
- Mélanger puis chauffer à la micro-onde jusqu'à dissolution complète environ 2 min
- Laisser refroidir un peu et ajouter 5 µl de GelRed™ (biotium) dans le mélange et homogénéiser

Préparation de la Cuve à électrophorèse

- Placer d'abord les peignes dans le moule puis couler le gel
- Attendre que le gel soit complètement solide avant de retirer les peignes environ 40 min
- Placer le portoir de gel dans la cuve à électrophorèse, remplir avec du tampon TBE 1X
- Charger les puits avec 5 µl d'amplicon mélangé avec du bleu de charge (sur parafilm)
- Mélanger 3 µl de marqueur de taille et 2 µl de dye sur le parafilm, bien homogénéiser puis déposer le mélange dans les deux puits extrêmes du gel.
- Couvrir la cuve avec les électrodes.
- Régler le générateur de courant à 110V et 400 mA puis le démarrer
- vérifier si le courant passe (petites bulles d'air au niveau des électrodes)
- Laisser migrer l'ADN pendant 40 min.
- A la fin de la migration, éteindre le générateur, enlever le couvercle et sortir le portoir pour la lecture sur la table à UV (GelDoc™).

Titre: Détermination d'une dose minimale efficace de Chlorfenapyr (Pyrolle) pour *Anopheles gambiae s.l.* dans une perspective de surveillance de la sensibilité à l'insecticide au Sénégal.

Nom du candidat : Asmiou SALL

Nature du mémoire : Master II en Biologie animale (Spécialité : Entomologie)

Membres du Jury :

Président : Dr: Lassana KONATE (Maitre de conférences, UCAD/FST)

Membres : Dr : Abdoulaye DIOP Vector Link/PMI/USAID

Dr : Elhaji Malick NGOM Institut Pasteur de Dakar (IPD)

Résumé

Cette étude a été menée durant la période allant du mois de septembre à Décembre 2018. Ainsi, par la méthode du test en bouteille du CDC qui utilise des Bouteilles CDC de 250 ml (type Wheaton), la sensibilité au chlorfénapyr a été évaluée sur 2208 spécimens du complexe *Anopheles gambiae*. L'échantillonnage des moustiques s'est effectué au Sénégal dans différentes localités que sont Dianké Makha, Diourbel, Koungheul, Nioro et Zac Mbao. Les moustiques ont en effet présenté une forte sensibilité au chlorfénapyr et la dose diagnostique varie en fonction des localités testées. L'identification moléculaire des spécimens à son tour a révélé la présence de 3 espèces du complexe *An. gambiae* à savoir *An.arabiensis*, *An. gambiae* s.s. et *An. Coluzzii*. Avec une predominance d'*An. arabiensis*. Les travaux ainsi réalisés pourront permettre au PNLP et d'autres parties prenantes à faire des choix éclairés concernant les outils les plus appropriés pour la lutte contre les vecteurs du paludisme et la gestion de la résistance aux insecticides.

Mots clés : *An. gambiae s.l.*, sensibilité, chlorfénapyr, Sénégal.

Summary

This study was conducted from September to December 2018. By the CDC bottle test method which uses CDC bottles of 250 ml (type Wheaton), the sensitivity to Chlorfenapyr was thus evaluated on 2208 specimens of *Anopheles gambiae* complex. Mosquitoes were sampled in Senegal in different localities such as Dianké Makha, Diourbel, Koungheul, Nioro and Zac Mbao. Mosquitoes have indeed shown a high sensitivity to Chlorfenapyr and the diagnostic dose varies according to the localities tested. The molecular identification of the specimens in turn revealed the presence of 3 species of the *An. Gambiae* complex namely *An.arabiensis*, *An. Gambiae* s.s. and *An. Coluzzii*. With a predominance of *An. arabiensis*.

Thus, this work carried out could allow PNLP and other stakeholders in making informed choices concerning the most appropriate tools for malaria vector control and insecticide resistance management.

Key words: *An. gambiae s.l.*, sensitivity, Chlorfenapyr, Senegal.