

BURKINA FASO

Unité-Progrès-Justice

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO (UPB)



INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES
DE LA SANTE (IN.S.SA)



Année universitaire 2011-2012

Mémoire N° 3

**EVALUATION EN PREVULGARISATION DE L'EFFICACITE DU KALTOX®
SUR DES POPULATIONS *KDR*-RESISTANTES D'*Anopheles gambiae* A LA
VALLEE DU KOU (VK6), BURKINA FASO**

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le 15 décembre 2012 pour l'obtention du diplôme de

Master de Parasitologie médicale

Par

Mohamed Ahmed ALI

Jury

Président : Mr. GUIGUEMDE T. Robert, Professeur titulaire (IN.S.SA/UPB)

Membres : Mr. DIABATE Abdoulaye, Maître de recherche (IRSS/CNRST)

Mr. DABIRE K. Roch, Maître de recherche (IRSS/CNRST), Directeur
du mémoire

REMERCIEMENTS

Au Professeur Robert T. GUIGUEMDE. Vous m'avez fait l'honneur de présider mon jury de mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de mes hommages respectueux.

A mon Directeur du mémoire, le Docteur Roch K. DABIRE. Vous m'avez accepté dans votre équipe et initié mes premiers pas à la recherche. Vous m'avez formé et accompagné pendant tout le déroulement de ce travail avec beaucoup de rigueur, de patience et de pédagogie. C'est tant d'honneur d'avoir accepté de diriger ce mémoire malgré vos multiples occupations. Veuillez trouver ici l'expression de mes profondes gratitude.

A Monsieur NAMOUNTOUGOU Moussa et SAWADOGO Simon. Vous m'avez apporté beaucoup d'aide, de temps et de soutien. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A toute l'Equipe d'entomologie de l'IRSS/Centre MURAZ, en particulier Monsieur OUATTARA Abdoulaye, OUARI Ali et YAMEOGO Bienvenu. Merci pour votre sympathie, votre aide et votre participation active à mes travaux.

A tous ceux qui m'ont prêté une oreille attentive et qui se sont réellement investis afin que ce travail voie le jour.

A mes parents. Vous m'avez toujours encouragé dans le choix de mes études. Merci d'avoir cru si fort en moi.

A mon oncle, Monsieur ISLAM Albousri. Vous m'avez apporté un soutien inestimable tout au long de mon séjour à l'étranger. Vos efforts ne sont pas et ne seront jamais vains.

A ma chère Mère, Madame OUEDRAOGO Mariame. Vous m'avez aidé à tenir le coup dans les moments difficiles. Merci pour vos encouragements toujours pertinents et pour vos conseils précieux. Veuillez trouver ici ma sincère reconnaissance et mes profonds respects.

Enfin et surtout, à touté la famille OUEDRAOGO. Vous m'avez accueilli les bras ouverts et accordé une confiance. Merci pour votre accueil, votre confiance et pour votre gentillesse.

Résumé

Outre la transmission du paludisme, la nuisance culicidienne constitue un problème majeur car son impact affecte l'acceptabilité des outils de lutte antivectorielle. Afin d'améliorer la lutte anticulicidienne et sa composante antivectorielle, notre travail a consisté en l'évaluation de l'efficacité entomologique d'une combinaison d'insecticides à base de pyréthrianoïdes et de carbamate en formulation aérosol (Kalttox®) dans les conditions réelles d'utilisation en zone de résistance.

L'étude s'est déroulée dans un quartier (VK6) de Bama, village rizicole à l'Ouest du Burkina Faso. Nous avons comparé l'efficacité du Kalttox® (formulation aérosol à base de pyréthrianoïdes combinés avec un carbamate) à celle d'Oro® (formulation aérosol à base de pyréthrianoïdes). Vingt cases ont été traitées de façon alternée avec Kalttox® et Oro® et cela pendant 2 semaines (chaque case test a été traitée avec l'un des 2 insecticides pendant une semaine). Dix autres cases ont été sélectionnées comme témoins (non traitées).

Les tests de sensibilité en tube OMS ont révélé des taux de mortalités de 67,34% et de 78,43% respectivement à la deltaméthrine et au bendiocarb. Une fréquence allélique de la mutation *Kdr* de 0,89 a été observée. Tous les moustiques testés appartenaient à la forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s.* Les taux de déterrence (effet dissuasif) étaient de 44% et de 43% respectivement dans les maisons traitées avec Kalttox® et Oro®. Le taux de mortalité dans les maisons traitées au Kalttox® (53,5%) était significativement plus élevé que celui observé dans les maisons traitées avec Oro® (22,7%) ($P < 0,0001$). Le taux d'inhibition du gorgement dans les maisons traitées au Kalttox® (26%) était significativement plus élevé que celui observé dans les maisons traitées avec Oro® (9,7%) ($P < 0,001$).

En dépit de la résistance prononcée chez *An. gambiae s.s.*, les résultats de notre étude montrent une meilleure efficacité du Kalttox® comparativement à l'insecticide de référence (Oro®). L'usage des pyréthrianoïdes combinés avec un carbamate pourrait améliorer le niveau de mortalité et différer la résistance.

Mots clés : Efficacité, Kalttox®, *Anopheles gambiae*, Vallée du Kou, Burkina Faso.

Abstract

In addition to the malaria transmission, nuisance of mosquitoes is a major problem because its impact affects the acceptability of vector control tools. In order to improve the fight against mosquitoes and its vector component, we assessed the field efficacy of an aerosol formulation using combination of pyrethroids and carbamate (Kaltox®), in area with resistance.

The study was conducted in area (VK6) of Bama, a rice-growing village of south-western Burkina Faso (West Africa). We compared Kaltox® (aerosol formulation using pyrethroids combined with carbamate) to Oro® (aerosol formulation using pyrethroids alone). Twenty houses were treated alternatively with both Kaltox® and Oro® for two weeks (each house was treated with one of both insecticides for one week). Ten others untreated houses were selected as control.

Bioassays revealed 67.34% and 78.43% as mortality rates respectively due to 0.05% deltamethrin and 0.1% bendiocarb. We observed 0.89 as frequency of *Kdr* mutation. All tested mosquitoes were identified as *An. gambiae* M form. Mosquito deterrence rates were 44% and 43% respectively in Kaltox® and Oro® houses. Mortality rate observed in Kaltox® houses (53.5%) was significantly higher than that of Oro® houses (22.7%) ($P < 0.0001$). The blood feeding inhibition rate observed in Kaltox® houses (26%) was significantly higher than that of Oro® houses (9.7%) ($P < 0.001$).

Our study showed high efficacy of Kaltox® compared to Oro®, in area with resistance. The use of pyrethroids combined with carbamate could improve mortality and delay resistance.

Key words: Efficacy, Kaltox®, *An. gambiae*, Kou Valley, Burkina Faso.

SOMMAIRE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| REMERCIEMENTS | i |
| Résumé..... | ii |
| Abstract..... | iii |
| SOMMAIRE | iv |
| Liste des abréviations utilisées..... | vii |
| Liste des figures | vii |
| Liste des tableaux..... | vii |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| I. GENERALITES | 3 |
| I.1. Taxonomie d' <i>An. gambiae</i> | 3 |
| I.2. Cycle gonotrophique d' <i>An. gambiae</i> | 3 |
| I.3. Cycle sporogonique | 4 |
| I.4. La lutte antivectorielle | 4 |
| I.4.1. La lutte antilarvaire | 4 |
| Aménagement de l'environnement | 5 |
| La lutte chimique..... | 5 |
| La lutte biologique | 5 |
| La lutte génétique | 5 |
| I.4.2. La lutte contre les adultes | 5 |
| La Pulvérisation intra domiciliaire..... | 5 |
| La pulvérisation spatiale extra domiciliaire | 6 |
| L'utilisation des moustiquaires | 6 |
| L'utilisation des répulsifs, des aérosols et des tortillons insectifuges..... | 6 |
| Les répulsifs | 6 |
| Les aérosols | 7 |
| Les tortillons insectifuges..... | 7 |
| I.5. Les insecticides | 7 |
| I.5.1. Les organochlorés | 7 |
| I.5.2. Les pyréthrinoïdes..... | 8 |
| I.5.3. Les organophosphorés et les carbamates | 8 |
| I.6. Les mécanismes de résistance d' <i>An. gambiae</i> aux insecticides..... | 8 |
| I.6.1. La résistance métabolique..... | 9 |
| I.6.2. La résistance par modification de la cible..... | 9 |
| I.6.3. La résistance comportementale..... | 10 |
| II. Problématique..... | 11 |
| III. MATERIELS ET METHODES..... | 12 |
| III.1. Site de l'étude..... | 12 |
| III.2. Présentation des formulations testées..... | 14 |
| III.3. Mode opératoire | 15 |
| III.4. Collecte des données..... | 16 |
| III.4.1. Collecte des données sur le terrain..... | 16 |
| III.4.1.1. Identification des moustiques collectés | 16 |
| III.4.1.2. Collecte des effets secondaires | 16 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.4.2. Les analyses au laboratoire..... | 17 |
| III.4.2.1. Les bioessais en tubes OMS..... | 17 |
| III.4.2.2. Identification de l'origine du repas de sang..... | 17 |
| III.4.2.3. Détermination de l'indice sporozoïtique..... | 18 |
| III.4.2.4. PCR diagnostiques d' <i>An. gambiae s.l.</i> , de la mutation <i>Kdr</i> et des Formes moléculaires M et S..... | 18 |
| III.5. Analyse des données..... | 19 |
| III.6. Aspects éthiques..... | 19 |
| IV. RESULTATS..... | 20 |
| IV.1. Taux d'entrée dans les maisons/ Effet dissuasif (déterrence)..... | 20 |
| IV.2. Taux de mortalité..... | 21 |
| IV.2.1. <i>An. gambiae s.l.</i> | 21 |
| IV.2.2. <i>Culex</i> | 22 |
| IV.2.3. Autres culicidés..... | 23 |
| IV.3. Taux de gorgement..... | 25 |
| IV.4. Les effets secondaires..... | 26 |
| IV.5. Les bioessais en tubes OMS..... | 26 |
| IV.6. L'origine du repas de sang..... | 27 |
| IV.7. L'indice sporozoïtique..... | 27 |
| IV.8. Distribution de la fréquence allélique du gène <i>Kdr</i> et des formes moléculaires M et S d' <i>An. gambiae</i> | 28 |
| V. DISCUSSION..... | 29 |
| V.1. Résistance d' <i>An. gambiae</i> aux insecticides à VK6..... | 29 |
| V.2. Composition spécifique d' <i>An. gambiae</i> à VK6..... | 29 |
| V.3. Les effets dissuasifs et létaux induits par les traitements Kaltox® 6s et Oro® 7s..... | 30 |
| V.4. Inhibition du gorgement induite par les traitements Kaltox® 6s et Oro® 7s..... | 31 |
| V.5. Origine du repas de sang..... | 31 |
| V.6. Indice sporozoïtique dans le quartier de VK6..... | 33 |
| V.7. Les effets secondaires..... | 33 |
| Conclusions et Perspectives..... | 34 |
| Recommandations..... | 34 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 35 |
| ANNEXES..... | A |
| Annexe 1 : Protocole des bioessais en tube OMS..... | A |
| Annexe 2 : Protocole des ELISA-repas de sang..... | B |
| Annexe 3 : Protocole des ELISA-CSP..... | D |
| Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN au CTAB, sur moustique entier..... | F |
| Annexe 5 : Protocole de la PCR diagnostique d' <i>An. gambiae s.l.</i> | F |
| Annexe 6 : Protocole de la PCR diagnostique des formes moléculaires M et S d' <i>An. gambiae s.s.</i> | G |
| Annexe 7 : Protocole de la PCR diagnostique de la mutation <i>Kdr</i> | H |

Liste des abréviations utilisées

| | |
|------------|------------------------------------------------------------------|
| AChE | AcétylCholinestErase |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| ACT | Combinaisons Thérapeutiques à base d'Arthémisinine |
| CEP | Comité d'Evaluation des Pesticides |
| CSP | CircumSporozoïteProtein |
| CILSS | Comité Inter-état de Lutte contre la Sécheresse au Sahel |
| CNaVdp | Canal Sodium Voltage dépendant |
| DDT | Dichloro Diphényl Trichloroéthane |
| DEET | Diéthyl toluamide |
| ELISA | Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay |
| GABA | Acide Gamma AminoButyrique |
| GST | Glutathion-S-Tranfêrase |
| <i>Kdr</i> | Knock down resistance |
| LAV | Lutte AntiVectorielle |
| MII | Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides |
| MILDA | Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides de Longue Durée d'Action |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PID | Pulvérisation IntraDomiciliaire |
| TDR | Test de Diagnostic Rapide |
| TPI | Traitement Préventif Intermittent |
| VK | Vallée du Kou |

Liste des figures

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure I : Site de l'étude à la vallée du Kou..... | 13 |
| Figure II : Présentation du Kalttox® en emballage commercial..... | 14 |
| Figure III : Présentation d'Oro® en emballage commercial..... | 14 |
| Figure IV : Dispositif expérimental de l'évaluation des insecticides Kalttox® 6s et Oro® 7s..... | 16 |
| Figure V : Comparaison de l'effet dissuasif induit par les traitements Kalttox® 6s et Oro® 7s..... | 21 |
| Figure VI : Comparaison des mortalités corrigées d' <i>An. gambiae s.l.</i> obtenues avec Kalttox® 6s et Oro® 7s..... | 22 |
| Figure VII : Comparaison des mortalités corrigées de <i>Culex spp</i> obtenues avec Kalttox® 6s et Oro® 7s..... | 22 |
| Figure VIII : Comparaison du taux de gorgement obtenu avec <i>An. gambiae</i> en fonction du traitement..... | 25 |
| Figure IX : Comparaison du taux d'inhibition du gorgement chez <i>An. gambiae</i> entre Kalttox® 6s et Oro® 7s..... | 25 |

Liste des tableaux

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Nombre de moustiques collectés dans les maisons témoins et traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s | 20 |
| Tableau 2 : Mortalité observée dans les maisons témoins et traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s | 24 |
| Tableau 3 : Les effets secondaires signalés chez les dormeurs des maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s | 26 |
| Tableau 4 : Les bioessais en tube OMS : Mortalité observée d' <i>An. gambiae</i> de VK6 aux insecticides testés, comparée a celle de la souche «Kisumu»..... | 27 |
| Tableau 5 : Origine du repas de sang en fonction du traitement..... | 27 |
| Tableau 6 : Répartition du nombre de moustiques infectés en fonction du traitement..... | 28 |
| Tableau 7 : Distribution de la fréquence allélique du gène <i>Kdr</i> chez les individus survivants et morts d' <i>An. gambiae s.s.</i> forme M en fonction du traitement. | 28 |

INTRODUCTION

Le paludisme reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde et représente un grand défi en santé publique en Afrique. En 2010, le rapport 2011 sur le paludisme dans le monde (World Malaria Report) a estimé à 216 millions, le nombre de cas de paludisme dans le monde avec 655 000 cas de décès dont 90%, provenaient de l'Afrique, au sud du Sahara [1].

Des outils thérapeutiques et diagnostiques sont utilisés dans le cadre de la prise en charge des cas de paludisme. En effet, les combinaisons thérapeutiques à base d'arthémisinine (ACT) sont recommandées contre le paludisme simple, tandis que la quinine est le traitement de choix contre le paludisme grave et le paludisme de la femme enceinte. Le diagnostic du paludisme peut être confirmé par un diagnostic parasitologique, effectué à l'aide de la microscopie ou d'un test de diagnostic rapide (TDR).

Les principaux outils de prévention sont le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes afin de prévenir les infections palustres dans les zones de forte transmission, les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) en l'occurrence de pyréthrianoïdes et la pulvérisation intra domiciliaire à effet rémanent (PID) pour lutter contre les insectes nuisibles et vecteurs de maladies.

À côté de ces outils de lutte antivectorielle (LAV) (*i.e.* MILDA et PID), les insecticides aérosols ainsi que les répulsifs et les tortillons insectifuges sont largement utilisés surtout pendant la saison des pluies favorable au développement des moustiques.

Dans les agglomérations urbaines et périurbaines à forte pression d'insectes particulièrement de culicidés à cause de la prolifération des gîtes anthropiques favorables au développement des moustiques causant la nuisance, ces produits sont utilisés quasiment toute l'année.

Bien que ne soient pas considérés formellement comme des outils à impact épidémiologique en LAV, les insecticides aérosols, les répulsifs et les tortillons insectifuges sont faciles à utiliser et contribuent largement à la lutte contre les culicidés adultes vecteurs du paludisme ou potentiellement vecteurs d'arboviroses telles que la dengue, la fièvre jaune et certaines encéphalites. Cependant, la finalité de ces derniers outils n'est pas toujours de pratiquer une LAV contre les vecteurs du paludisme ou d'arboviroses mais d'apaiser le sommeil, de réduire la nuisance créée par les culicidés tels que les *Culex*, les *Mansonia* et les *Aedes* ou de lutter contre certains insectes domestiques rampants tels que les cafards, les fourmis, les araignées et les grillons, toute chose qui contribue à améliorer l'hygiène et le cadre de vie.

Néanmoins, la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrianoïdes en LAV constitue une limite à leur utilisation. Le premier cas de résistance des anophèles aux pyréthrianoïdes fut

déte t    Bouaké en Côte d'Ivoire [2]. Cette résistance a été ensuite observée dans bien d'autres pays d'Afrique de l'Ouest où la mutation *Kdr* Leu-Phe a été mise en évidence comme principal mécanisme impliqué dans la résistance aux pyr thrino ides [3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9].

La résistance aux pyr thrino ides est attribuée à une résistance ultérieurement sélectionnée par l'utilisation massive du DDT en agriculture [3 ; 10 ; 11].

Des travaux antérieurs ont également décrit en Afrique de l'Ouest la présence de la résistance aux carbamates et aux organophosphorés, la mutation *ace-1^R* a été mise en évidence comme principal mécanisme de résistance d'*An. gambiae* aux organophosphorés et aux carbamates [9 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16].

D'autres mécanismes de résistance aux insecticides, notamment par la détoxification enzymatique, ont été aussi rapportés en Afrique de l'Ouest au Benin [8 ; 9] et plus récemment au Burkina Faso [7].

Pour différer la résistance, des combinaisons d'insecticides à différents modes d'action ont été testées et peuvent être utilisées [17 ; 18 ; 19 ; 20].

Au Burkina Faso, notamment dans la région soudanienne, la résistance du vecteur majeur du paludisme, *An. gambiae*, vis-à-vis des pyr thrino ides et du DDT, associée à la mutation *Kdr* Leu-Phe a été rapportée par Dabiré *et al* [21] et quelques années plutôt par Diabaté *et al* [22]. Plus récemment, Dabiré *et al* ont observé une multi résistance chez *An. gambiae* dans les savanes humides de l'Ouest du Burkina Faso [15], avec la présence concomitante de mécanismes de résistance aux pyr thrino ides, aux organophosphorés et aux carbamates.

Afin d'améliorer la lutte anticulicidienne dans un contexte de résistance en pleine extension, notre travail a consisté en l'évaluation de l'efficacité entomologique d'une combinaison d'insecticides à base de pyr thrino ides et de carbamate en formulation aérosol (Kaltox®) en zone de résistance.

Cette efficacité a été comparée à celle d'un produit de référence (Oro®), homologué par le Comité d'Evaluation des Pesticides (CEP) du Comité Inter- tat de Lutte contre la Sécheresse au Sahel (CILSS).

Nous avons testé l'efficacité du Kaltox® en zone de résistance afin de fournir les informations scientifiques qui vont constituer un outil d'aide à la décision pour l'homologation de ce produit par le CEP du CILSS.

I. GENERALITES

I.1. Taxonomie d'*An. gambiae*

An. gambiae appartient à l'Embranchement des Arthropodes, à la Classe des Insectes, à l'Ordre des Diptères, au sous-ordre des Nématocères et à la famille des *Culicidae*. Cette famille regroupe trois sous-familles à savoir la sous-famille des *Anophelinae*, la sous-famille des *Culicinae* et la sous-famille des *Aedinae*. La sous-famille des *Anophelinae* est constituée de trois genres, notamment, le genre *Bironella*, le genre *Chagasia* et le genre *Anopheles*. Il existe environ 500 espèces du genre *Anopheles*, dont une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'Homme [23].

En Afrique subsaharienne, les vecteurs du paludisme se répartissent entre les espèces du complexe *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. nili* [24; 25]. Le complexe *An. gambiae* est reconnu comme composé de sept espèces, dont trois, seulement vectrices : *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* et *An. melas* [24 ; 25 ; 26]. Cette dernière espèce serait vectrice au niveau du littoral et jouerait un rôle secondaire par rapport à *An. gambiae s.s.* [26 ; 27 ; 28].

Certains auteurs ont mis en évidence *An. moucheti* comme vecteur très secondaire par rapport à *An. gambiae* et circonscrit en Afrique centrale [29 ; 30].

Au Burkina Faso, *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* et *An. funestus* sont les trois espèces considérées comme les principaux vecteurs du paludisme [31 ; 32].

I.2. Cycle gonotrophique d'*An. gambiae*

Les adultes nouvellement émergents s'accouplent. L'accouplement a lieu dans les essaims. Les moustiques femelles ne s'accouplent généralement qu'une seule fois et conservent le sperme dans leurs spermathèques pour assurer la fécondation des œufs durant tout leur cycle de vie. Elles ont besoin de repas sanguin pour porter leurs œufs à maturité. Parmi les femelles, on distingue schématiquement celles qui préfèrent se nourrir à l'intérieur (endophages) de celles qui se nourrissent à l'extérieur (exophages). On observe également des femelles qui préfèrent se nourrir soit sur l'homme (anthropophiles) soit sur l'animal (zoophiles). Après chaque repas sanguin, la femelle se réfugie dans un abri appelé gîte de repos jusqu'au développement complet des œufs. Parmi les femelles, on distingue celles qui se reposent à l'intérieur (endophiles) de celles qui préfèrent se reposer à l'extérieur (exophiles). Quand les œufs sont prêts, la femelle se met à la recherche d'une collection d'eau appelée gîte larvaire. Il s'agit la plupart du temps d'eaux douces, peu agitées, peu profondes, ensoleillées et peu polluées en matière organique. Une fois le gîte larvaire choisi, les œufs sont pondus un par un

sur la surface de l'eau et de chaque œuf sortira une larve qui a un mode de vie exclusivement aquatique. Après quatre stades larvaires, la larve donnera une nymphe d'où émergera un individu adulte (imago).

I.3. Cycle sporogonique

Le cycle sporogonique s'écoule entre l'ingestion de gamétocytes et la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires. Seule la femelle du genre *Anopheles* est susceptible de transmettre le paludisme. Elle s'infecte à la faveur d'un repas de sang pris sur un sujet infesté porteur de gamétocytes, formes infectantes pour le moustique. Dans l'estomac du moustique, les éléments asexués (*i.e.* trophozoïtes, schizontes, etc.) sont digérés. Le gamétocyte femelle s'arrondit et donne un unique gamète femelle tandis que le gamétocyte mâle se divise en huit gamètes mâles mobiles. La fécondation du gamète femelle par le gamète mâle aboutit à la formation d'un zygote mobile appelé ookinète qui est le seul stade diploïde du parasite. Celui-ci subit une réduction chromosomique par méiose. Il traverse la paroi de l'estomac et se fixe sur la face externe de l'estomac et forme un oocyste dans le quel s'individualisent les sporozoïtes. L'oocyste libère des milliers de sporozoïtes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagneront par la suite les glandes salivaires. La femelle est alors infectante et épidémiologiquement dangereuse. Les sporozoïtes seront injectés lors du prochain repas de sang, faisant démarrer le cycle du parasite chez l'Homme. Une fois infectée, la femelle le reste toute sa vie et infecte ses hôtes à chacun de ses repas sanguins jusqu'à sa mort. La durée du cycle varie en fonction de l'espèce plasmodiale et de la température extérieure. Pour *Plasmodium falciparum*, la durée du cycle est de 12 jours à 25°C. En dessous de 18°C et au-dessus de 33°C, le cycle s'arrête [33].

I.4. La lutte antivectorielle

Les méthodes de LAV peuvent être classées en deux catégories : la lutte antilarvaire et la lutte contre les adultes. Elles ont toutes pour objectif de réduire la transmission du paludisme.

I.4.1. La lutte anti larvaire

Une lutte antilarvaire est bénéfique quand les gîtes sont limités en nombre, facilement identifiables, et faciles d'accès. Elle vise à réduire la densité vectorielle en diminuant la production des moustiques. Les méthodes utilisées dans la lutte antilarvaire se classent en quatre catégories :

- **Aménagement de l'environnement**

Cette méthode de lutte repose sur les travaux de drainage et l'hygiène péri domestique.

- **La lutte chimique**

Elle consiste à traiter des gîtes larvaires avec des insecticides qui sont de nature chimiques.

- **La lutte biologique**

Il s'agit de l'utilisation de prédateurs ou de bactéries entomopathogènes [34]. En santé publique, les seuls succès enregistrés par l'utilisation de poissons larvivores culiciphages concernent les zones où les gîtes larvaires sont souvent très limités et repérables [35].

- **La lutte génétique**

Elle concerne essentiellement le lâcher de males stériles dans certaines régions bien délimitées [36]. Elle participe à la réduction des populations de moustiques par modification de leur patrimoine génétique [37].

I.4.2. La lutte contre les adultes

La lutte contre les adultes peut être pratiquée à plusieurs niveaux :

- **La Pulvérisation intra domiciliaire**

Cette technique est encore utilisée en Afrique pour lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An. gambiae* et *An. funestus*. Elle vise à réduire la densité vectorielle en augmentant la mortalité des adultes. Cependant, les traitements intra domiciliaires présentent l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages, maintenant ainsi un niveau minimal de transmission. Le DDT a petit à petit été remplacé par des insecticides moins toxiques pour l'environnement, mais tout aussi efficaces comme certains organophosphorés (malathion), carbamates (bendiocarb), ou pyréthrinoïdes (deltaméthrine) [38].

- **La pulvérisation spatiale extra domiciliaire**

Cette technique est définie comme la destruction de moustiques en vol par contact avec des insecticides (pyréthrinoïdes ou organophosphorés) en l'air. Elle a un cout élevé et son utilisation doit être réservée aux situations d'épidémie. Elle vise à réduire la densité vectorielle en augmentant la mortalité des adultes.

- **L'utilisation des moustiquaires**

Bien que les moustiquaires non traitées soient depuis longtemps utilisées pour se protéger des piqures de moustiques, l'avènement de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) a considérablement augmenté leur efficacité, ajoutant à l'effet de barrière physique, un effet répulsif et létal vis-à-vis des moustiques [39]. En effet, l'effet répulsif des pyréthrinoïdes empêche le moustique de se gorger au travers de la moustiquaire et d'y pénétrer lorsque celles-ci sont trouées après un certain temps d'utilisation. L'effet létal sur les moustiques est important, mais variable selon l'insecticide choisi et l'espèce cible. Dans la mesure où la plupart des anophèles piquent la nuit et à l'intérieur des maisons, les MII sont considérées par l'OMS comme le meilleur outil de protection individuelle contre le paludisme, et ce quel que soit le contexte épidémiologique.

Par ailleurs, l'utilisation des rideaux imprégnés peut constituer une méthode complémentaire aux moustiquaires imprégnées.

Au Burkina Faso, l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine a par exemple permis de réduire significativement la transmission du paludisme [40].

Les moustiquaires et les rideaux imprégnés visent à réduire le contact homme-vecteur.

- **L'utilisation des répulsifs, des aérosols et des tortillons insectifuges**

Des outils complémentaires de protection individuelle sont disponibles et largement utilisés comme les insecticides aérosols, les tortillons insectifuges ou les répulsifs appliqués sur la peau. Ces outils complémentaires, bien que ne soient pas considérés comme une stratégie de LAV à large échelle, contribuent à réduire le contact homme-vecteur.

Les répulsifs

Un répulsif est composé d'une substance active (synthétique ou naturelle) et de différents excipients formant une formulation pouvant se présenter sous forme de spray ou de lotion de crèmes. Il existe de nombreux produits sur le marché (*e.g.* le citriodiol et le diéthyl toluamide : DEET). La durée de protection varie de 6 à 12 heures selon la substance active.

Les aérosols

Les aérosols sont très populaires dans les pays en voie de développement et sont essentiellement composés d'insecticides pyréthrinoïdes à action rapide et à fort effet knock-down. Ils n'ont aucun effet rémanent. Certaines firmes commercialisent des aérosols contenant du propoxur (carbamate) qui possède un mode d'action différent des pyréthrinoïdes. Des aérosols contenant à la fois de pyréthrinoïdes et des carbamates sont également sur le marché. Ces aérosols possèdent deux modes d'action différents sur les insectes, ce qui différencierait la résistance.

Les tortillons insectifuges

Ces tortillons sont très utilisés. Une fois allumés, ils brûlent lentement et régulièrement et diffusent de l'insecticide qui tue ou qui tient les moustiques à distance par un effet aérien. Ces produits sont énormément répandus dans les pays en développement, car ils sont accessibles et bon marché. Toutefois, de grandes différences sont observées entre les différents produits. À l'origine, les tortillons étaient imprégnés d'alléthrine (à 0,2% ou 0,3%) et/ou de transalléthrine (à 0,10% ou 0,15%). Le tortillon se consume généralement entre 6 et 8 heures et doit reposer sur un petit support métallique pour être efficace.

I.5. Les insecticides

Les insecticides actuellement disponibles peuvent être classés en quatre familles : les organochlorés, les pyréthrinoïdes, les organophosphorés et les carbamates.

I.5.1. Les organochlorés

Cette famille regroupe le DDT et ses analogues, le lindane et les Cyclodiènes.

Le lindane et les Cyclodiènes agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma aminobutyrique (GABA), tandis que le DDT agit à la fois sur le système nerveux central et périphérique en modifiant les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant (CNaVdp).

I.5.2 Les pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes regroupent plusieurs produits, dont la perméthrine et la deltaméthrine. Chaque pyréthriinoïde possède des effets répulsifs, irritants, knock-down et létaux d'intensité variable. Ils sont très rémanents et leur concentration efficace est très inférieure à celle des autres produits, ce qui réduit d'autant les frais d'utilisation. Ils sont très peu toxiques pour les mammifères et ils sont largement utilisés en agriculture et en santé publique dans des stratégies collectives ou pour un usage domestique.

Les pyréthriinoïdes agissent sur le système nerveux central et périphérique en modifiant les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques des protéines des CNaVdp. Ces canaux, une fois activés (en position ouverte), entraînent un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Cette dépolarisation de la membrane cellulaire provoque l'activation du CNaVdp situé à proximité et de proche en proche, engendrant ainsi une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux.

I.5.3. Les organophosphorés et les carbamates

Les organophosphorés et les carbamates sont plus toxiques et leur moindre rémanence oblige à consommer des quantités plus importantes. Ils sont donc peu utilisés pour la LAV antipaludique.

Les organophosphorés et les carbamates agissent sur l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine en acide acétique et en choline. L'acétylcholine agit comme neuromédiateur des synapses cholinergiques.

La fixation des organophosphorés et des carbamates sur l'AChE entraînent l'accumulation d'acétylcholine dans la jonction synaptique. Lorsque sa concentration est devenue trop forte, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte, induisant ainsi la paralysie puis la mort de l'insecte.

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique et c'est leur forme oxydée qui se fixe sur l'AChE, tandis que les carbamates agissent directement sans oxydation préalable.

I.6. Les mécanismes de résistance d'*An. gambiae* aux insecticides

Le terme de résistance a été défini par l'OMS comme « la faculté chez une souche d'un organisme donné à tolérer les doses d'un produit toxique qui tue la majorité des individus d'une population normale de la même espèce ».

Les différents mécanismes qui permettent aux insectes de résister à l'action des insecticides peuvent être regroupés en trois catégories :

I.6.1. La résistance métabolique

Ce mécanisme repose sur les systèmes enzymatiques que tous les insectes possèdent pour assurer la détoxification naturelle des éléments étrangers. Généralement, trois catégories d'enzymes interviennent dans cette fonction, à savoir les estérases, les oxygénases à cytochromes P450 et les glutathion-S-transférases (GST). Ces enzymes sont surproduites par les moustiques résistants par rapport aux moustiques sensibles et leur permettent de métaboliser ou de dégrader les molécules d'insecticides avant qu'elles n'exercent un effet toxique sur leur cible.

I.6.2. La résistance par modification de la cible

Le second type de mécanisme de résistance communément trouvé chez les insectes est la modification de la cible de l'insecticide. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux : l'AChE, le CNaVdp et le récepteur du GABA.

Les mutations au niveau de la cible sont des mécanismes de résistance très efficaces qui s'accompagnent de phénomènes de résistance croisée pour tous les insecticides agissant sur la même cible.

La cible des organophosphorés et des carbamates est l'AChE, une enzyme située dans les synapses des cellules nerveuses. La forme mutée retrouvée chez *An. gambiae*, principal vecteur du paludisme en Afrique intertropicale, résulte d'une mutation de la glycine en serine en position 119 du gène codant pour l'AChE (mutation *ace-1^R*) conférant une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés [41].

La cible des pyréthriinoïdes et du DDT est le CNaVdp qui intervient dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Les pyréthriinoïdes et le DDT agissent au niveau des CNaVdp et perturbent le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx nerveux le long des fibres nerveuses.

Une mutation ponctuelle remplaçant une leucine par une phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le CNaVdp (mutation *Kdr* Leu-Phe) confère une résistance aux pyréthriinoïdes et aux DDT en Afrique de l'Ouest [42].

En Afrique de l'Est, c'est plutôt le remplacement de la leucine par une serine à la même position (mutation *Kdr* Leu-Ser) qui confère la résistance aux pyréthriinoïdes [43].

Les organochlorés du groupe des Cyclodiènes ont leur site d'action au niveau des récepteurs du GABA du système nerveux central.

I.6.3. La résistance comportementale

La résistance comportementale repose sur une modification du comportement de l'insecte lui permettant d'éviter le contact avec l'insecticide. La résistance comportementale est moins bien connue que les autres mécanismes de résistance.

II. Problématique

Avec l'émergence de la résistance chez les *Culex* et les anophèles vecteurs, la gestion de la nuisance demeure une priorité surtout que son impact affecte l'acceptabilité des outils de lutte contre les vecteurs. Le problème de nuisance est l'une des raisons d'utilisation des insecticides aérosols même si par ailleurs cette pratique peut contribuer à réduire de façon substantielle la transmission du paludisme. Mais à ce niveau, on peut aussi constater le problème de résistance puisque la plupart des aérosols utilisent les mêmes molécules d'insecticides que celles utilisées en santé publique. Ces insecticides aérosols sont le plus souvent intensément employés en utilisation domestique, ce qui pourrait amplifier davantage la résistance des vecteurs déjà indirectement sélectionnée par l'usage intensif des pesticides en agriculture.

Afin d'améliorer l'efficacité des insecticides aérosols (mais aussi celle des répulsifs et des tortillons insectifuges), notre travail a consisté en l'évaluation de l'efficacité entomologique d'une combinaison d'insecticides à base de pyréthriinoïdes et de carbamate en formulation aérosol (Kalttox®) en zone de résistance. Cette efficacité a été comparée à celle d'un produit de référence, Oro®, composé seulement de pyréthriinoïdes. Ce produit de référence est déjà homologué par le CEP du CILSS.

Nous nous sommes proposés d'évaluer l'efficacité du Kalttox® afin de fournir les informations scientifiques qui vont constituer un outil d'aide à la décision pour l'agrément de ce produit par le comité d'homologation.

Le processus d'évaluation de cette efficacité a impliqué trois phases d'essai suivant les protocoles de l'OMS [44]. La phase I est effectuée dans les conditions de laboratoire. L'évaluation en phase II est exécutée dans les cases expérimentales. Ces deux dernières phases étant déjà réalisées, ce présent rapport avait pour objectif d'évaluer l'efficacité en pré-vulgarisation. L'objectif principal de l'évaluation en pré-vulgarisation était d'évaluer l'efficacité du Kalttox® dans les conditions réelles d'utilisation en zone de résistance.

Les objectifs spécifiques étaient de :

1. Déterminer le taux de déterrence (effet dissuasif) induite par les traitements Kalttox® et Oro®.
2. Déterminer le taux de mortalité.
3. Déterminer le niveau de résistance et des fréquences alléliques du gène *Kdr*.
4. Déterminer le taux d'inhibition du gorgement.
5. Collecter les effets secondaires chez l'Homme.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Site de l'étude

Cette étude a été réalisée dans le quartier 6 de la Vallée du Kou (VK6). La Vallée du Kou est localisée entre 4° 24' 59'' de longitude Ouest et 11° 24' 1'' de latitude Nord. Elle est située à 30 km au Nord de Bobo- Dioulasso, au Burkina Faso. C'est un périmètre rizicole aménagé depuis 1970 s'étendant sur une superficie de 1 200ha. Il est composé de 7 quartiers rizicoles. Le riz est la principale culture. Il est entouré par une savane boisée dans la zone soudanienne caractérisée par deux saisons: une saison sèche de Novembre à Avril et une saison des pluies de Mai à Octobre avec une pluviométrie annuelle moyenne de 1 200 mm. La culture de riz utilise très peu d'insecticides, mais ils sont intensivement utilisés dans les champs environnants pour lutter contre les ravageurs du cotonnier. Le système d'irrigation des plaines est basé sur une déviation de la rivière Kou qui est la source permanente d'alimentation hydrique. Deux cycles de culture y sont pratiqués par an impliquant une mise en eau des casiers rizicoles de Janvier à Mai et de Juin à Novembre.

À cause du système d'irrigation et de la disponibilité en eau, les casiers rizicoles créent en permanence des gîtes très productifs aux culicidés. D'autres gîtes favorables aux anophèles composés de dépressions et de retenues d'eau s'y ajoutent pendant la saison des pluies.

An. gambiae y est retrouvée à de fortes densités toute l'année, mais principalement en saison des pluies. Les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.* y vivent en sympatrie mais à des fréquences relatives variables suivant la saison. La forme M y est prédominante toute l'année avec cependant une augmentation de la fréquence de la forme S de l'ordre de 20-45% vers la fin de la saison des pluies (Septembre-Novembre).

La mutation *Kdr* est présente dans les deux formes moléculaires à des fréquences alléliques très variables entre 0,8 et 1 dans la forme S et entre 0,04 et 0,5 dans la forme M [45]. La mutation *ace-1^R* est aussi présente dans les deux formes avec une fréquence allélique différentielle de 0,4 chez la forme S vs. 0,03 chez la forme M [15] faisant de ce site une zone de multirésistance *Kdr* et *ace-1^R* chez *An. gambiae s.s.* surtout vers la fin de la saison des pluies.

An. funestus et *An. arabiensis*, autres vecteurs du paludisme, sont trouvés à de densités relatives faibles (3-5%). *Culex quinquefasciatus*, moustique non vecteur, est aussi observé à des fréquences de moins de 10%. Le genre *Mansonia* y est également présent et constitue l'un des culicidés causant la nuisance.

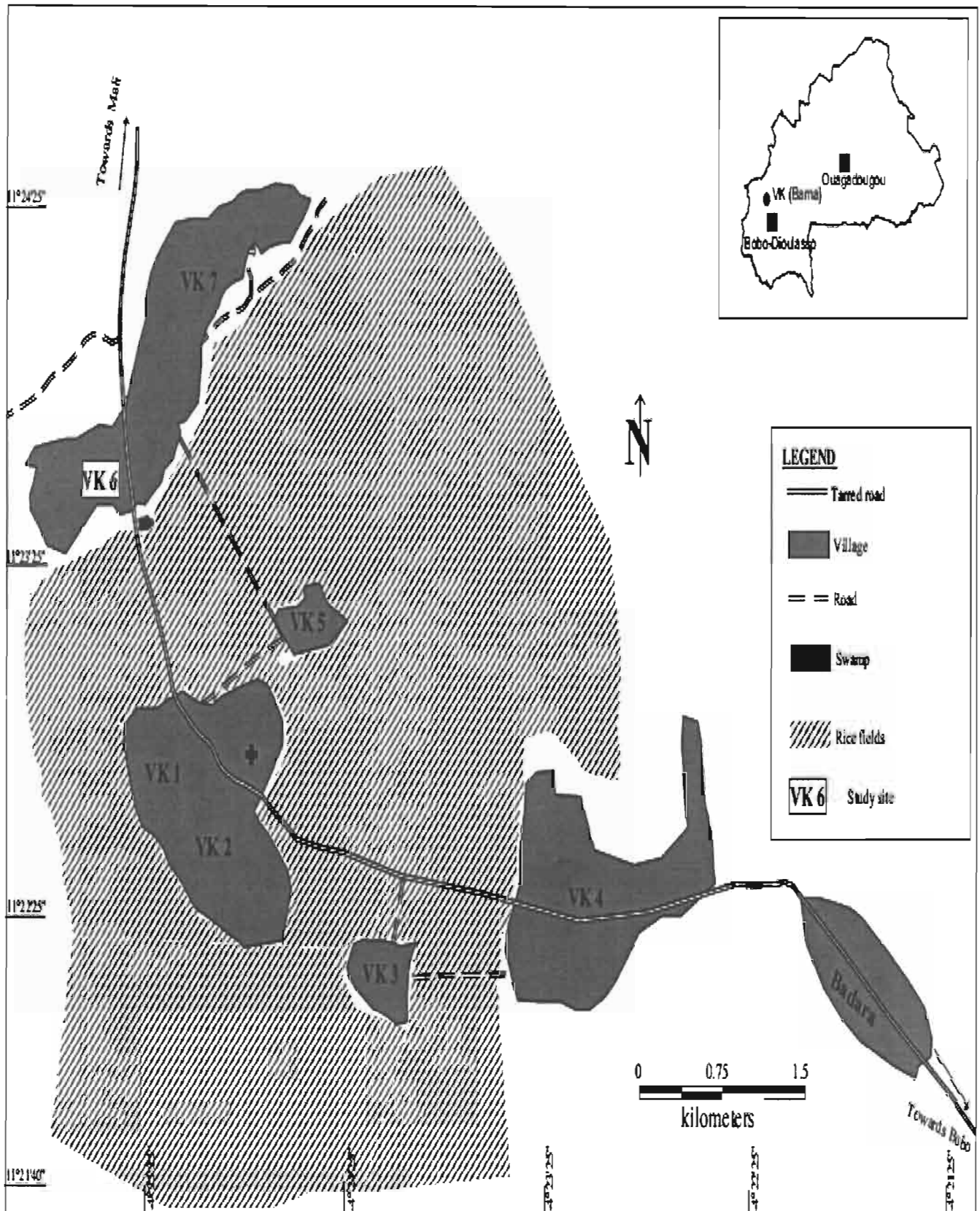


Figure 1 : Site de l'étude à la Vallée du Kou

III.2. Présentation des formulations testées

Les formulations testées dans ce présent travail étaient Kaltox® et Oro®. Ce sont des insecticides de synthèse de type aérosol.

Le Kaltox® est une combinaison de pyréthrinoïdes et de carbamate composée d'Alléthrine 0,27%, Tétraméthrine 0,20 %, Perméthrine 0,17%, Propoxur 0,68%, Solvant, propulseur et de parfum 98,68%.



Figure II : Présentation du Kaltox® en emballage commercial

La formulation Oro® est un mélange de pyréthrinoïdes constitué de Perméthrine 0,25%, Tétraméthrine 0,20%, d-fenothrine 0,01%, solvant et de propulseur 99,54%.



Figure III : Présentation d'Oro® en emballage commercial

III.3. Mode opératoire

Il s'agissait d'un essai de pré-vulgarisation qui visait à évaluer à l'échelle d'un village l'efficacité du Kaltox® dans les conditions réelles d'utilisation. Cette efficacité a été comparée à celle d'Oro®, considéré comme produit de référence homologué par le CEP du CILSS.

Dix maisons séparées, chacune de l'autre de 20 mètres au moins, ont été sélectionnées par un échantillonnage aléatoire dans le quartier de VK6 pour recevoir un traitement avec du Kaltox®. Elles ont été appariées à dix autres cases qui ont été pulvérisées avec Oro®. Chaque paire était séparée d'au moins 30 mètres (30 à 50 mètres).

Une rotation des cases traitées a été faite après une semaine de traitement : les cases traitées avec Kaltox® ont reçu la deuxième semaine Oro® comme traitement.

Dix maisons contrôles (sans traitement insecticide) ont été également sélectionnées par un échantillonnage aléatoire dans la zone de traitement et séparées des maisons traitées d'au moins 30 mètres.

Les maisons ont été traitées quotidiennement à 19 heures pendant 15 jours allant du 4 au 20 septembre 2011. Cette durée correspondait à une répétition du traitement pendant 15 jours équivalents à une taille de l'échantillon de $10 \times 15 = 150$ captures/nuits.

Un captureur a été affecté à chaque case et une rotation des captureurs a été observée durant les 15 jours de traitement.

La dose de Kaltox® appliquée a été la dose Kaltox® 6s qui a été la plus efficace révélée pendant la Phase II et compte tenu de la taille des maisons qui était en moyenne plus grande ($4 \times 3 \times 3$ m) que celle utilisée en Phase II ($3,5 \times 2 \times 2$ m). Elle a été comparée à la dose d'Oro® 7s.

Au bout de 20 minutes d'attente après la pulvérisation, les occupants pouvaient s'introduire dans leurs maisons et dormir de 20 heures à 6 heures du matin. À 6 heures, ils sont réveillés et les captureurs ont assuré les collectes de moustiques dans leurs cases.

Tous les moustiques morts et vivants ont été collectés. Les moustiques morts ont été ramassés à l'aide des pinces tandis que ceux vivants ont été capturés à l'aide des tubes à hémolyse.

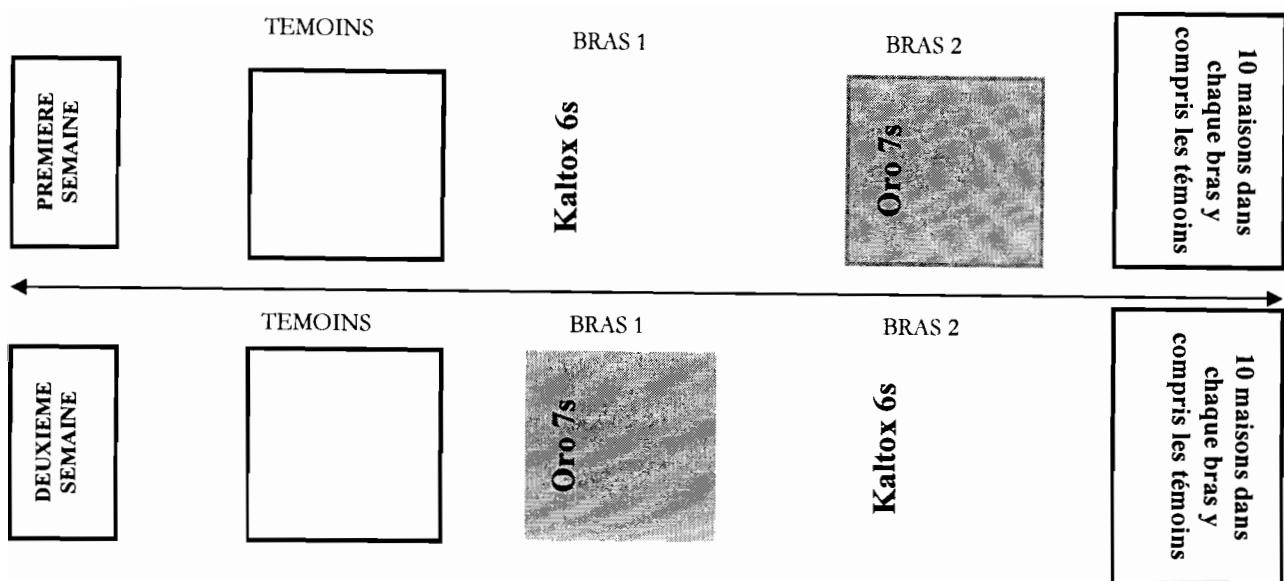


Figure IV : Dispositif expérimental de l'évaluation des insecticides Kaltox® 6s et Oro® 7s.

III.4. Collecte des données

III.4.1. Collecte des données sur le terrain

III.4.1.1. Identification des moustiques collectés

Les moustiques collectés ont été identifiés sous une loupe binoculaire à l'aide des clés de détermination morphologique [46]. Ils ont été comptés et classés selon qu'ils soient morts ou vivants. Les femelles d'*An. gambiae* ont été ensuite classées selon leur état dans la case : à jeun, gorgées, mortes et vivantes. Celles vivantes ont été mises en observation pendant 24 heures dans des gobelets individuels avec du jus sucré pour la lecture de la mortalité différée. Toutes ces femelles d'*An. gambiae* ont été stockées dans des tubes 1, 5 ml contenant du silicagel et portant les références des moustiques (date, lieu de capture, traitement, à jeun ou gorgées, mortes ou vivantes). Elles ont été alors conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation en ELISA et en PCR.

III.4.1.2. Collecte des effets secondaires

Les dormeurs ont été interrogés quotidiennement sur les effets secondaires éventuels ressentis en dormant dans cet environnement traité aux insecticides. Nous avons utilisé un questionnaire pour collecter les effets secondaires. Nous avons utilisé la méthode de simple aveugle pour le traitement des maisons avec les insecticides (les dormeurs ignoraient s'ils recevaient Kaltox® ou Oro®).

III.4.2. Les analyses au laboratoire

III.4.2.1. Les bioessais en tubes OMS

La mortalité de la population locale d'*An. gambiae* de VK6 a été évaluée par un test en tube OMS avec du papier imprégné à la deltaméthrine (Delta) 0,05% (à défaut de papier imprégné à la perméthrine) et au bendiocarb (bendio) 0,1% (à défaut de papier imprégné au propoxur). Elle a été après comparée à celle de la souche sensible de référence d'*An. gambiae* «Kisumu» pour déterminer le statut de sensibilité de la souche locale avant le lancement de l'évaluation. Les anophèles femelles soumis aux tests sont issus des pontes de femelles capturées semi-gravides à l'intérieur des maisons dans le quartier de VK6.

La souche d'*An. gambiae* de VK6 a été maintenue en insectarium à l'IRSS. Les larves ont été nourries à la TetraMin® et élevées dans les conditions de température égale à 27°C, d'humidité relative maintenue à 75% en moyenne et d'alternance jour/nuit de 12 heures. Les adultes ont émergé dans des cages recouvertes de tissu moustiquaire et nourris quotidiennement avec du glucose à 5% pendant au moins 2 jours avant d'être soumis aux tests.

Quatre lots de 25 femelles à jeun d'*A. gambiae* âgées de 2 à 5 jours ont été exposés aux papiers imprégnés à la Delta et au bendio dans des tubes OMS pendant une heure [47]. Après une heure d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes exempts d'insecticide en présence de jus sucré pour une observation. La mortalité finale a été estimée 24 heures après l'exposition à l'insecticide et de mise en observation (cf. annexe 1). Le seuil de sensibilité a été fixé à 98% : sont considérés comme sensibles les échantillons ayant montré une mortalité comprise entre 98-100%, de résistance intermédiaire entre 80-98% et résistants pour une mortalité inférieure à 80% [3].

III.4.2.2. Identification de l'origine du repas de sang

Des analyses du repas sanguin des femelles gorgées ont été effectuées au laboratoire pour apprécier l'origine du repas de sang déterminée selon la méthode décrite par Beier *et al.* [48]. Le principe des ELISA repas de sang est basé sur une réaction antigène-anticorps révélée par l'activité enzymatique responsable de l'émission de substrats chromogènes (cf. annexe 2). Le choix des anticorps testés a été fait en tenant compte des animaux qui étaient fréquemment rencontrés dans la zone d'étude et sur lesquels les anophèles pourraient se gorger. Ainsi, cinq anticorps ont été testés : anticorps anti-humain, anti-porc, anti-bovin, anti-âne et anti-mouton. Ces anticorps ont été tous marqués à la peroxydase et stockés à 4°C. Au total, 300 anophèles

femelles gorgées ont été testées. Un échantillon de 100 spécimens a été retenu dans chacun des lots de maisons témoins et traitées avec Kalttox® 6s ou Oro® 7s.

III.4.2.3. Détermination de l'indice sporozoïtique

L'indice sporozoïtique a été déterminé pour évaluer le niveau de transmission du paludisme dans notre site d'étude. Nous avons utilisé la technique ELISA en sandwich pour mettre en évidence les protéines circumsporozoïtes exprimées par les sporozoïtes dans les glandes salivaires des moustiques [49]. Cette technique utilise deux anticorps spécifiques à l'antigène. L'un de ceux-ci est couplé à une enzyme, la peroxydase. Le principe de cette technique est basé sur une réaction antigène-anticorps révélée par l'activité enzymatique responsable de l'émission de substrats chromogènes (cf. annexe 3).

Nous avons testé un échantillon de 918 moustiques collectés aussi bien dans les maisons témoins que traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s.

III.4.2.4. PCR diagnostiques d'*An. gambiae s.l.*, de la mutation *Kdr* et des Formes moléculaires M et S

L'ADN génomique des moustiques a été extrait (cf. annexe 4) et amplifié par la technique PCR pour identifier les espèces du complexe *An. gambiae s.l.* [50] (cf. annexe 5), déterminer les formes moléculaires M et S de l'espèce *An. gambiae s.s.* [51] (cf. annexe 6) et détecter la présence de la mutation *Kdr* [4] (cf. annexe 7). Le principe de la PCR est basé sur une réaction cyclique d'amplification qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN ciblée pour la rendre visible. La PCR utilise en plus de l'ADN matrice, un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, une ADN polymérase (la Taq polymérase), les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) et une solution tampon (Hcl, Mgcl₂). Chaque cycle est une succession de trois étapes à savoir la dénaturation en simples brins de l'ADN matrice, l'hybridation des oligonucléotides amorces spécifiques aux brins matrices et la polymérisation des brins complémentaires des brins matrices par la Taq Polymérase. Les produits PCR sont visualisés et analysés sous la lampe UV après dépôt et migration électrophorétique sur gel d'agarose.

III.5. Analyse des données

Les quatre paramètres entomologiques suivants ont été mesurés et comparés entre les deux traitements :

1. Le taux de déterrence induite, obtenu en comparant le nombre de moustiques collectés dans les cases traitées par rapport à la case témoin.
2. Le taux de gorgement, obtenu en comparant les pourcentages de femelles gorgées par rapport au total collecté par case.
3. Le taux d'inhibition du gorgement en comparant le taux de femelles gorgées dans les cases traitées par rapport à celui de la case témoin.
4. Le taux de mortalité obtenu en comparant le nombre de moustiques morts par rapport au nombre total de moustiques capturés dans la case.

Le test de chi 2 a été utilisé pour comparer deux à deux les paramètres entomologiques tandis que le test de chi 2 pour série appariée a été utilisé pour comparer les effets secondaires. D'autres tests non paramétriques (test de Kruskal Wallis et de Mann Whitney) ont été aussi réalisés pour confirmer les résultats des tests Chi 2. Les taux de mortalité ont été systématiquement corrigés par la formule d'Abott quand ceux des témoins correspondants étaient supérieurs à 5% (formule associée au tableau 2). La valeur de $P=0,05$ était retenue comme seuil de signification statistique.

III.6. Aspects éthiques

Avant toute participation, un consentement volontaire a été obtenu auprès des dormeurs qui ont confirmé leur consentement par écrit et avec une signature. Les dormeurs non alphabétisés ont confirmé leur consentement par une empreinte digitale et avec une signature d'un témoin indépendant sachant lire et choisi par le dormeur. Le protocole de cette étude a été soumis et validé par le comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ.

IV. RESULTATS

IV.1. Taux d'entrée dans les maisons/ Effet dissuasif (déterrence)

Au total 5955 moustiques, tous culicidés confondus, ont été collectés dans les cases témoin contre 3339 et 3357 dans les maisons traitées respectivement avec Kalttox® 6s et Oro® 7s (tableau 1) après 15 jours de capture. Le taux d'entrée dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s a été très homogène et quasi identique entre les deux traitements. *An. gambiae s.l.* a représenté 95,5% du total de culicidés collectés dans les maisons témoins pour 87,45% et 90,7% collectés respectivement dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s. Les autres espèces anophéliennes collectées (0,8% dans les maisons témoin, 3,4% avec Kalttox® 6s vs 3,15% pour Oro® 7s) sont composées d'espèces non vectrices de paludisme que sont essentiellement *An. pharoensis* et *An. coustani*. Des spécimens appartenant au genre *Mansonia* ont été collectés à de très faibles proportions (moins de 3% tous traitements confondus). Les moustiques du genre *Culex* collectés dans les maisons aussi bien dans les témoins (3,8%) que les traitées (6,9% pour Kalttox® 6s vs 4,58% pour Oro® 7s) sont un mélange de deux espèces incluant *C. quinquefasciatus* et *C. vivatus*, une espèce plus fréquente dans les zones rurales. Mais nous n'avons pas pu calculer la proportion de chaque espèce dans les effectifs collectés. Le taux de déterrence (ou effet dissuasif) a été similaire pour les deux insecticides avec respectivement une réduction du taux d'entrée de 44% et de 43,6% dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s comparé aux maisons témoins (figure 5).

Tableau 1 : Nombre de moustiques collectés dans les maisons témoins et traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s.

| Espèce | Témoins | | Kalttox® 6s | | Oro® 7s | |
|-------------------------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|------|
| | N | % | N | % | N | % |
| <i>An. gambiae s.l.</i> | 5676 | 95,53 | 2920 | 87,45 | 3047 | 90,7 |
| Autres | 48 | 0,8 | 115 | 3,44 | 106 | 3,5 |
| <i>Anopheles</i> | | | | | | |
| <i>Culex spp</i> | 226 | 3,8 | 230 | 6,9 | 154 | 4,58 |
| <i>Mansonia sp</i> | 5 | 0,08 | 74 | 2,2 | 50 | 1,49 |
| Total | 5955 | | 3339 | | 3357 | |

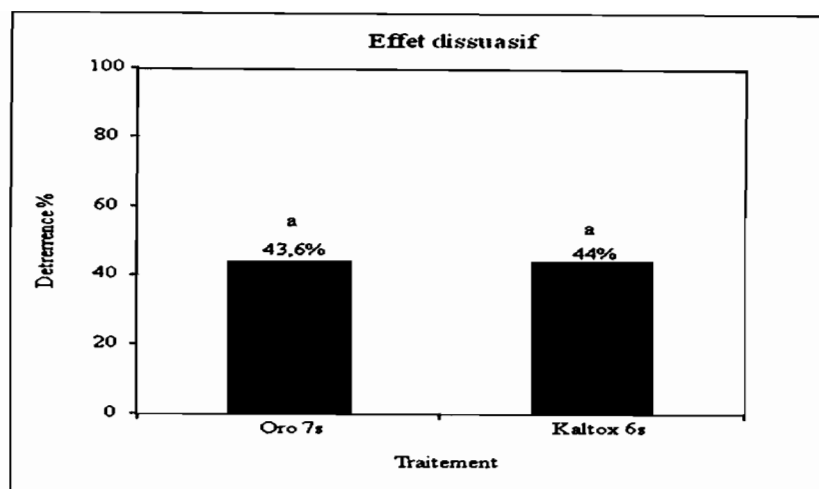


Figure V : Comparaison de l'effet dissuasif induit par les traitements Kaltox® 6s et Oro® 7s (les données suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $P > 0,05$).

*Formule effet dissuasif : $\frac{\text{nb de moustiques maisons témoins} - \text{nb de moustiques maisons « traitées »}}{\text{Nb de moustiques maisons témoins}} \times 100$

IV.2. Taux de mortalité

A l'exception des *Culex*, les taux de mortalité observés dans les cases témoins ont été supérieurs à 5%. Ils ont donc été corrigés par la formule d'Abott [Mortalité corrigée = (Mortalité « traitées » - Mortalité « témoin » / 100 - Mortalité « témoin ») * 100].

IV.2.1. *An. gambiae s.l.*

La mortalité observée dans les maisons témoin a été de 9,6%, celle-ci est supérieure à 5%. Une correction de cette mortalité dans les maisons traitées a donc été nécessaire par la formule d'Abbott. Le taux de mortalité corrigée a été de 53,5% dans les maisons traitées avec Kaltox® 6s et significativement plus élevé à celui obtenu dans les maisons traitées avec Oro® 7s ($\chi^2=460$, ddl=1, $P < 0,0001$).

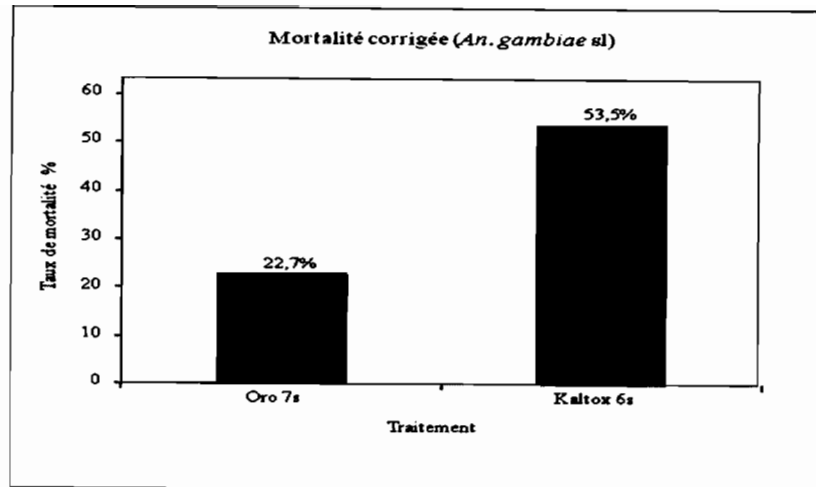


Figure VI : Comparaison des mortalités corrigées d'*An. gambiae s.l.* obtenues avec Kaltox® 6s et Oro® 7s

IV.2.2. *Culex*

Le taux de mortalité obtenu dans les maisons témoins pour ce genre a été de 1,2%. Ce taux était inférieur à 5% donc aucune correction de la mortalité n'a été nécessaire. Dans les maisons traitées avec Kaltox® 6s, le taux de mortalité obtenu avec ce genre a été de 58% et significativement supérieur à celui obtenu dans les maisons traitées avec Oro® 7s et qui a été de 34,4% ($\chi^2=21$; ddl=1; $P<0,001$) (figure 3).

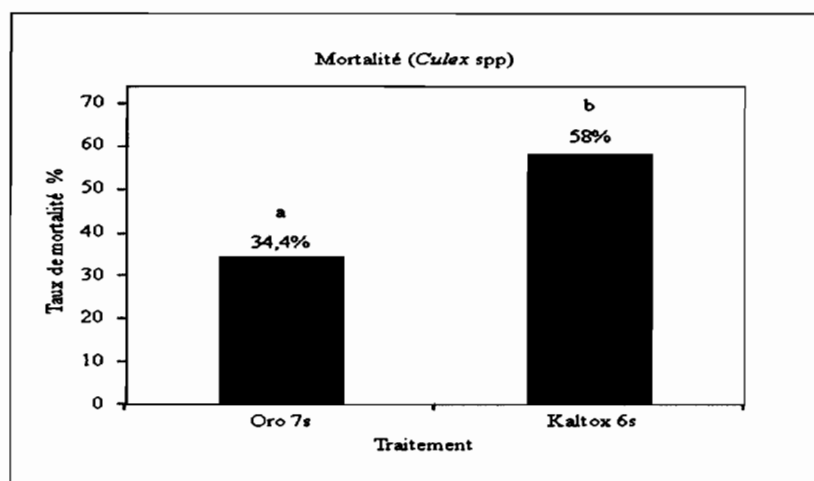


Figure VII : Comparaison des mortalités corrigées de *Culex spp* obtenues avec Kaltox® 6s et Oro® 7s (les données suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes, $P>0,05$).

IV.2.3. Autres culicidés

Le taux de mortalité des autres culicidés dans les maisons témoins a été de 31,2% pour les spécimens d'*Anopheles spp* et de 100% pour le genre *Mansonia*. Après correction de la mortalité dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s, les mortalités étaient toujours de 100% pour les deux insecticides pour les deux taxons considérés (tableau 2).



Tableau 2 : Mortalité observée dans les maisons témoins et traitées avec Kaltox® 6s et Oro® 7s

| Statut des moustiques | Témoins | | | | Kaltox® 6s | | | | Oro® 7s | | | |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| | <i>An. gambiae sl</i> | <i>Anopheles sp</i> | <i>Culex sp</i> | <i>Mansonia sp</i> | <i>An. gambiae sl</i> | <i>Anopheles sp</i> | <i>Culex sp</i> | <i>Mansonia sp</i> | <i>An. gambiae sl</i> | <i>Anophel es sp</i> | <i>Culex s.p.</i> | <i>Mansonia sp</i> |
| Morts | 383 | 15 | 4 | 5 | 1 688 | 115 | 141 | 74 | 912 | 102 | 53 | 58 |
| Vivants | 3 597 | 33 | 330 | 0 | 1 233 | 0 | 102 | 0 | 2 112 | 0 | 101 | 0 |
| Total | 3980 | 48 | 334 | 5 | 2921 | 115 | 243 | 74 | 3024 | 102 | 154 | 58 |
| Overall mortality % | 9,6% | 31,2% | 1,2% | 100% | 58% | 100% | 58% | 100% | 30,15% | 100% | 34,4% | 100% |
| Mortalité corrigée= % | - | - | - | - | 53,5% | 100% | 58% | 100% | 22,7% | 100% | 34,4% | 100% |

Correction formule d'Abott = Mortalité corrigée = [(Mortalité «traitées» - Mortalité «témoins») / 100 - Mortalité «témoins»] * 100.

IV.3. Taux de gorgement

Les taux de gorgement d'*An. gambiae s.l.* ont été de 68,68%, 50,26% et de 62% respectivement dans les maisons témoins, traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s, ce qui n'a donné aucune différence significative entre les maisons témoins de celles traitées avec Oro® 7s. Cependant ils ont été significativement plus bas dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s. Les taux d'inhibition du gorgement déduits à partir des témoins sont de 26% avec les traitements Kalttox® 6s et seulement de 9,7% avec les traitements Oro® 7s. En d'autres termes le traitement Kalttox® 6s a réduit le taux de piqure de 26% ce qui a été très significatif comparé à Oro® 7s ($\chi^2=66,99$; ddl=1, $P<0,001$).

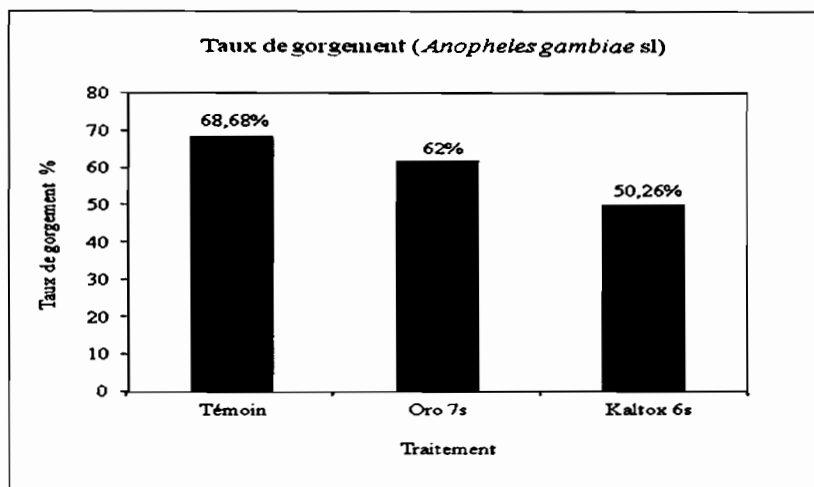


Figure VIII : Comparaison du taux de gorgement obtenu avec *An. gambiae* en fonction des traitements (du taux de gorgement, l'inhibition du gorgement sera déduite et comparée en figure 9)

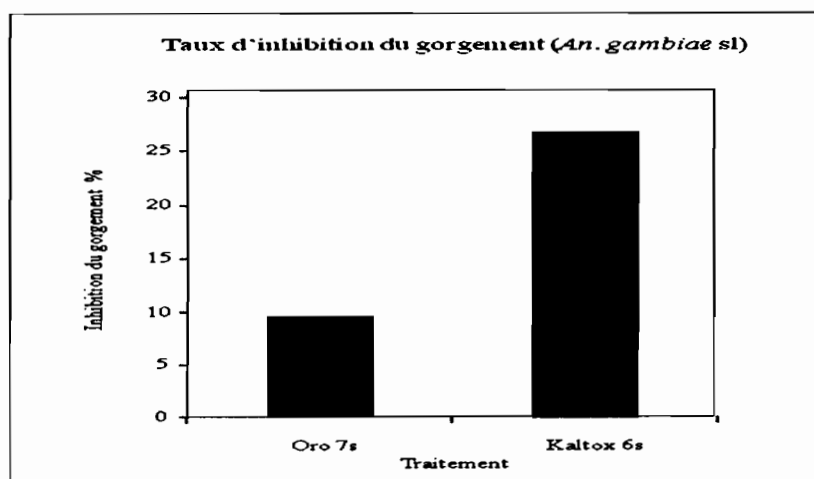


Figure IX : Comparaison du taux d'inhibition du gorgement chez *An. gambiae* entre Kalttox® 6s et Oro® 7s.

IV.4. Les effets secondaires

Les effets secondaires les plus fréquemment rendus par les dormeurs sont représentés par le rhume, la toux (petite toux passagère due à l'irritation du système respiratoire) et une irritation de la peau (grattage fugace). Le délai de survenue des effets secondaires a varié de 2 à 5 jours après le début du traitement Oro® 7s. Les effets secondaires avaient régressé quelques heures après leur apparition. Aucun effet secondaire n'a été observé chez les dormeurs après traitement de leurs maisons avec Kalttox® 6s. A l'inverse, le rhume a été signalé 3 fois dans la première semaine, la toux 1 fois par semaine et l'irritation passagère à la peau 2 fois à la première semaine sous traitement Oro® 7s. Mais la comparaison statistique n'a révélé aucune différence significative entre ces 2 traitements en terme d'effets secondaires (test Chi 2 – séries appariées, $P > 0,08$).

Tableau 3 : Les effets secondaires signalés chez les dormeurs des maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s.

| Rhume | | | |
|--------------|-------------|---------|-------|
| | Kalttox® 6s | Oro® 7s | Total |
| Oui | 0 | 3 | 3 |
| Non | 150 | 147 | 297 |
| Total | 150 | 150 | 300 |

| Toux | | | |
|--------------|-------------|---------|-------|
| | Kalttox® 6s | Oro® 7s | Total |
| Oui | 0 | 2 | 2 |
| Non | 150 | 148 | 298 |
| Total | 150 | 150 | 300 |

| Irritation de la peau | | | |
|------------------------------|-------------|---------|-------|
| | Kalttox® 6s | Oro® 7s | Total |
| Oui | 0 | 2 | 2 |
| Non | 150 | 148 | 298 |
| Total | 150 | 150 | 300 |

IV.5. Les bioessais en tubes OMS

Les taux de mortalité ont varié en fonction de l'insecticide et de la souche anophélienne testés. Avec la souche «Kisumu», la mortalité observée a été de 100% pour la Delta 0,05% et de 98,98% pour le bendio 0,1%. Avec la souche de VK6, les mortalités obtenues étaient de 67,34% pour la Delta 0,05% et de 78,43% pour le bendio 0,1%. Les mortalités observées dans les lots témoins étaient moins de 5%, aucune correction n'a été donc nécessaire.

Tableau 4 : Les bioessais en tube OMS : Mortalité observée d'*An. gambiae* de VK6 aux insecticides testés comparée à celle de la souche «Kisumu»

| | <i>An. gambiae</i> «Kisumu» | | <i>An. gambiae</i> «VK6» | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------|-----------------------------|--------------|
| | Delta 0,05% | Bendio 0,1% | Delta 0,05% | Bendio 0,1% |
| Effectif testé | 104 | 99 | 98 | 102 |
| Mortalité % | 100 | 98,98 | 67,34 | 78,43 |

IV.6. L'origine du repas de sang

Le test ELISA repas de sang réalisé sur les 300 femelles gorgées d'*An. gambiae* a révélé que, 2 repas de sang avaient été pris sur l'hôte humain, soit un taux d'anthropophilie de 0,67%, 262 avaient été pris sur les animaux, soit un taux de zoophilie de 87,33% et 36 avaient été pris à la fois sur les hôtes humain et animal, soit un taux d'anthropozoophilie de 12%. Sur les 100 repas de sang observés dans les maisons contrôles, 24% étaient des repas mixtes (pris sur les hôtes humain et animal). Ces repas mixtes étaient de 1% (1/100) et de 13% (13/100) respectivement dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s. Nous avons observé une différence statistiquement significative entre les maisons témoins et traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s en terme de repas mixtes ($\chi^2=25,19$; ddl=2 ; $P<0,05$).

Tableau 5 : Origine du repas de sang en fonction du traitement

| | Témoins | Kalttox® 6s | Oro® 7s | Total |
|---------------|---------|-------------|---------|-------------|
| Homme | 0 (0) | 0 (0) | 2 (2) | 2 (0,67) |
| Animal | 76 (76) | 99 (99) | 87 (87) | 262 (87,33) |
| Mixte | 24 (24) | 1 (1) | 11 (11) | 36 (12) |
| Total | 100 | 100 | 100 | 300 |

IV.7. L'indice sporozoïtique

Sur un total de 918 *An. gambiae* femelles testées aux ELISA CSP, 5 ont été porteuses de sporozoïtes, soit un indice sporozoïtique de 0,54%. Sur les 5 moustiques infectés, 3 avaient été collectés dans les maisons traitées avec Oro® 7s contre 2 collectés dans les cases témoins. Aucun moustique infecté n'a été trouvé dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s. Cependant, nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative de l'indice sporozoïtique entre les maisons témoins et traitées avec Oro® ($\chi^2=2,58$; ddl=2 ; $P=0,28$).

Tableau 6 : Répartition du nombre de moustiques infectés en fonction du traitement

| | Témoins | Kaltox® 6s | Oro® 7s | Total |
|--------------------------------------|---------|------------|---------|-------------|
| Effectif testé | 279 | 304 | 335 | 918 |
| Nombre de moustiques infectés | 2 | 0 | 3 | 5 |
| Indice sporozoitique | 0,72 | 0 | 0,97 | 0,54 |

IV.8. Distribution de la fréquence allélique du gène *Kdr* et des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

Les résultats de la PCR ont montré que la population d'*An. gambiae* collectée à l'intérieur des habitations dans le quartier de VK6 appartenait à l'espèce *An. gambiae s.s* constitué de 100% de formes M. Sur les 128 spécimens testés en PCR, 121 (89%) portaient la mutation *Kdr* à l'état homozygote ou hétérozygote (Tableau 7). Chez les moustiques survivants, les fréquences alléliques de la mutation *Kdr* ont été de 0,9; 0,95 et de 0,85 respectivement dans les maisons témoins, traitées avec Kaltox® 6s et Oro®7s. Chez les spécimens morts, cette fréquence a été de 0,88 dans les maisons traitées avec Kaltox® 6s et Oro® 7s, ce qui ne donnait aucune différence statistiquement significative entre les individus survivants de ceux collectés morts ($P>0,05$).

Tableau 7 : Distribution de la fréquence allélique du gène *Kdr* chez les individus survivants et morts d'*An. gambiae s.s* forme M en fonction du traitement

| | Témoins | | Kaltox® 6s | | Oro® 7s | | Total | |
|-----------------------------|---------|------|------------|------|---------|------|-------|------|
| | N | F(R) | N | F(R) | N | F(R) | N | F(R) |
| <i>An. gambiae</i> M | | | | | | | | |
| Survivants | 32 | 0,90 | 21 | 0,95 | 20 | 0,85 | 73 | 0,90 |
| Morts | 0 | 0 | 29 | 0,88 | 26 | 0,88 | 55 | 0,88 |
| Total | 32 | 0,90 | 50 | 0,91 | 46 | 0,86 | 128 | 0,89 |

V. DISCUSSION

V.1. Résistance d'*An. gambiae* aux insecticides à VK6

Les tests réalisés en tube OMS avec la souche d'*An. gambiae* de la localité de VK6 ont montré des mortalités de l'ordre de 67% et de 78% respectivement à la Delta et au bendio. Ces taux de mortalité sont inférieurs à 80%, seuil de sensibilité. Ceci indique que les populations d'*An. gambiae* sont résistantes au bendio 0,1% et à la Delta 0,05% et de façon générale aux pyréthrinoïdes à la Vallée du Kou [15 ; 21]. La résistance observée serait due à l'usage intensif des insecticides pour le traitement des cultures d'une part et, d'autre part, ceux utilisés pour réduire le contact homme-vecteur. Cette utilisation d'insecticides induit une pression de sélection sur les populations des anophèles qui favorise les moustiques porteurs du gène de résistance.

Des travaux antérieurs ont mis en évidence une multi résistance à la Vallée du Kou où les moustiques sont à la fois résistants aux pyréthrinoïdes et aux carbamates avec des fréquences relatives des mutations *Kdr* Leu-Phe et *ace-1^R* dans les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* [15 ; 16 ; 21 ; 45].

Nous avons identifié une fréquence allélique de la mutation *Kdr* de l'ordre de 0,9, ce qui confirme que VK6 à l'instar du quartier 7 (VK7) est une zone de résistance d'*An. gambiae* s.s. aux insecticides. Le niveau de la mutation *Kdr* ici obtenu nous paraît très élevé par rapport à celui observé en 2006 par Dabiré *et al.* Cette différence pourrait s'expliquer par une extension de la mutation *Kdr* de VK7 où elle a été identifiée quelques années plutôt [15 ; 22].

Nous avons observé une fréquence allélique de la mutation *Kdr* statistiquement similaire entre les moustiques survivants et ceux morts ($P>0,05$). Cette similarité s'expliquerait par le fait que les échantillons testés appartiennent à la même population.

V.2. Composition spécifique d'*An. gambiae* à VK6

Sur un total de 128 spécimens testés en PCR, aucun *An. arabiensis* n'a été représenté. Cette observation est conforme à celle de Dabiré *et al* [52]. Ainsi, cette espèce serait absente sinon rare dans cette zone de la Vallée du Kou beaucoup plus propice à la forme M d'*An. gambiae* s.s. qui a été la seule forme identifiée dans notre site d'étude. Un travail antérieur réalisé dans ce même site a montré 88,5% de formes M [52]. Cette zone rizicole semble donc être un milieu favorable à la forme M. En effet le caractère rizicole de la Vallée du Kou marqué par des cultures irriguées rend possible tout au long de l'année l'installation des gîtes larvaires permanents favorables au développement des formes M [53]. La forme S n'a pas été

représentée. Une étude a montré sa faible proportion ne dépassant pas 30% dans cette localité de la Vallée du Kou même lors de son pic maximal à la fin de la saison des pluies à l'interface avec la savane là où s'arrêtent les champs de riz [22]. Notre travail a été réalisé en septembre, période peu favorable à l'installation de la forme S comme l'ont indiqué les travaux antérieurs.

V.3. Les effets dissuasifs et létaux induits par les traitements Kaltox® 6s et Oro® 7s

Nous avons observé un taux de déterrence de l'ordre de 44% qui a été similaire pour les deux traitements, Kaltox® 6s et Oro® 7s, comparé aux cases témoins. Cette observation indique que les deux traitements ont réduit significativement les entrées des moustiques dans les maisons. La réduction des entrées serait due aux effets dissuasifs et irritants exercés par les insecticides sur les moustiques.

Des études ayant porté sur des matériaux imprégnés de pyréthrinoïdes (perméthrine et Delta) et de carbamate (carbosulfan) ont montré une réduction des entrées dans les maisons équipées de ces matériaux imprégnés par rapport aux cases témoins [3 ; 17 ; 36].

Le taux de déterrence ici obtenu nous paraît faible par rapport à celui trouvé en 2006 dans le même site où plus de 90% de réduction des entrées avait été observée avec des moustiquaires imprégnées de perméthrine et de Delta [52]. Les pyréthrinoïdes ayant le même mode d'action, cette différence importante pourrait s'expliquer par le fait que les pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation de ces moustiquaires sont rémanents, par contre les aérosols utilisés dans notre étude n'ont aucun effet rémanent. La non rémanence des pyréthrinoïdes pourrait avoir un impact significatif sur la réduction des entrées des moustiques à l'intérieur des maisons.

Nous avons observé un taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* de l'ordre de 9,6% dans les maisons témoins. Cette observation se justifie par la présence de moustiquaires imprégnées déjà en utilisation dans les maisons. Cette pratique assurerait une mortalité « naturelle » de 9,6% d'*An. gambiae s.l.* même si nous sommes dans un faciès de résistance d'*An. gambiae* aux pyréthrinoïdes (les moustiquaires étant imprégnées à la perméthrine ou à la Delta).

Nous avons observé des taux de mortalité d'*An. gambiae* de l'ordre de 53% et de 22% respectivement dans les maisons traitées avec Kaltox® 6s et Oro® 7s. Nous avons également observé des mortalités du genre *Culex* de l'ordre de 58% et de 34% respectivement dans les maisons traitées avec Kaltox® 6s et Oro® 7s. Ces observations montrent que ces deux insecticides confèrent une efficacité en termes de mortalité pour les espèces d'*An. gambiae* et du genre *Culex* puisque la différence avec le lot témoin était significative ($P < 0,0001$). Toutefois, le produit Kaltox® 6s confère une efficacité supérieure en termes de mortalité pour

avec le lot traité avec Oro® 7s était significative. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus en Phase II dans les cases expérimentales où l'insecticide Kalttox® 6s a montré une meilleure efficacité en termes de mortalité par rapport à Oro® 7s (Rapport d'évaluation en phase II).

Nous avons observé des fortes mortalités dans les maisons témoins de l'ordre de 31% pour les spécimens d'*Anopheles spp* (*An. pharoensis* et *An. coustani*) et de 100% pour le genre *Mansonia*. Cette observation suggère que ces culicidés sont toutes sensibles aux pyréthrinoïdes imprégnées dans les moustiquaires utilisées dans les maisons témoins.

Nous avons observé des mortalités de 100% d'*Anopheles spp* et du genre *Mansonia* dans les maisons traitées avec Kalttox® 6s et Oro® 7s. Cette observation suggère que ces culicidés, source de nuisance par leur pique sont totalement contrôlés par l'utilisation de ces deux insecticides (ceci répond plus à l'objectif des insecticides aérosols, des répulsifs et des tortillons insectifuges). Ces résultats corroborent ceux obtenus en phase II qui conféraient une mortalité supérieure avec Kalttox® 6s et 4s comparées à Oro® quelle que soit sa dose appliquée. Toutefois, les taux de mortalité élevés (100%) des spécimens du genre *Mansonia* pourraient aussi s'expliquer par le fait que les effectifs collectés pour ce genre ont été faibles. Il est à noter que les taux de mortalité observés pourraient être sous-estimés car nous avons réalisé cette étude dans des conditions non contrôlées où certains moustiques seraient pas trouvés.

V.4. Inhibition du gorgement induite par les traitements Kalttox® 6s et Oro® 7s

Nous avons observé des taux d'inhibition du gorgement d'*An. gambiae* de l'ordre de 26% avec le traitement Kalttox® 6s et seulement de 9,7% avec le traitement Oro® 7s. Cette observation montre que le traitement Kalttox® 6s a réduit significativement le taux de pique puisque la différence avec le lot témoin et traité avec Oro® 7s était significative. Ces taux d'inhibition au gorgement confirment ceux obtenus en phase II qui conféraient une meilleure protection que procure Kalttox® 6s quand il est pulvérisé dans les maisons. Il est à noter cependant que l'inhibition du gorgement serait aussi due à la présence des MII qui a contribué à maintenir un taux de gorgement relativement bas de 68% dans les cases témoins dans un contexte de pullulation culicidienne caractéristique des zones rizicoles favorables au développement des moustiques.

V.5. Origine du repas de sang

Nous avons observé des repas d'origine humaine, soit un taux d'anthropophilie de l'ordre de 0,6%. Le taux d'anthropophilie ici obtenu nous paraît très faible par rapport à celui de 30%

faible. Cette différence pourrait aussi s'expliquer par le fait que les moustiquaires imprégnées étaient beaucoup plus utilisées en 2011 qu'en 2006. Cette utilisation à grande échelle des moustiquaires imprégnées se justifie par la présence d'une forte densité de moustiques dans ce village où un taux d'agressivité de l'ordre de 306 piqures par homme et par nuit a été observé [54].

Nous avons observé des repas d'origine animale, soit un taux de zoophilie très élevé de l'ordre de 87%. Ce résultat suggère que la population d'*An. gambiae* de VK6 aurait un comportement trophique zoophile. Cette tendance a été observée antérieurement dans ce même site [52 ; 55]. La forte zoophilie de cette localité serait associée à la fois à l'abondance des animaux et à leur accessibilité aux espèces de moustiques. La présence des femelles zoophiles à l'intérieur des maisons pourrait s'expliquer par le fait qu'elles sont endophiles. En effet, l'utilisation à grande échelle des MII fait que les moustiques viennent à l'intérieur des maisons juste pour se reposer et pas pour se nourrir sur les humains.

Nous avons observé un taux de repas mixtes significativement élevé dans les maisons témoins comparativement aux maisons traitées avec Kaltox® 6s et Oro® 7s. Cette observation suggère que dans le cas des maisons traitées, il y a eu très peu de moustiques qui sont entrés à cause de l'effet dissuasif, par conséquent il y a eu une réduction de repas pris sur l'Homme et donc de repas mixtes. Dans le cas des maisons témoins les moustiques ont eu quand même l'occasion de piquer l'Homme, d'où l'augmentation de repas humains et donc de repas mixtes. Nous n'avons pas pu utiliser des marqueurs biologiques pour confirmer si les moustiques se sont nourris sur les dormeurs occupants des maisons. Cependant, dans la mesure où la plupart des anophèles piquent la nuit et à l'intérieur des maisons, nous pourrions supposer que les moustiques ont pris leur repas de sang d'origine humaine sur les dormeurs. Si tel est le cas, le traitement Kaltox® 6s aurait inhibé significativement le taux de pique sur l'hôte humain puisque la différence avec le lot témoin était significative ($P=0,002$). De plus, le traitement Kaltox® 6s aurait inhibé significativement le taux de pique sur l'hôte humain par rapport à Oro® 7s puisque la différence avec le lot traité avec Oro® 7s était significative ($P<0,05$). Cette tendance a été observée en Côte-d'Ivoire où l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'une combinaison d'insecticides à base de pyréthrianoïde et de carbamate a inhibé le taux de pique sur l'homme par rapport aux moustiquaires imprégnées seulement de pyréthrianoïdes [17].

V.6. Indice sporozoïtique dans le quartier de VK6

Dans notre site d'étude, on note qu'une faible fraction de la population d'*An. gambiae* prend son repas de sang sur les humains. Ce faible taux de repas pris sur l'Homme chez les vecteurs pourrait expliquer le faible indice sporozoïtique dans la zone où nous avons trouvé au cours de notre étude 0,5% d'anophèles femelles porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires durant la saison des pluies, considérée comme la période de forte transmission.

Cet indice sporozoïtique nous paraît faible par rapport à celui observé en 2008 à VK7 où un indice sporozoïtique de l'ordre de 3% a été noté [15]. Cette différence serait due au fait que la taille de l'échantillon testé en 2008 a été faible d'une part et, d'autre part, la présence d'une forte proportion de la forme moléculaire S à VK7 qu'à VK6. La forte présence de formes S à VK7 contribuerait à l'augmentation de la valeur de l'indice sporozoïtique puisque les individus de la forme S participent de façon significative à la transmission du paludisme [15]. Nous n'avons observé aucun spécimen infecté dans les maisons traitées avec Kaltox® 6s. Nous avons observé 2 et 3 moustiques infectés respectivement dans les maisons témoins et traitées avec Oro® 7s. Cependant, la comparaison statistique ne révèle aucune différence significative du nombre de moustique infecté entre les maisons témoins et traitées avec Oro® 7s. Cette égalité pourrait s'expliquer par la présence d'un indice sporozoïtique faible dans la population générale d'*An. gambiae* de VK6.

V.7. Les effets secondaires

Les quelques cas d'effets secondaires impliquant le rhume, la toux et l'irritation de la peau ont été rapportés dans les maisons traitées avec Oro®. Aucun effet secondaire n'a été rendu par les usagers des maisons traitées avec Kaltox® 6s. Nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative entre les cases traitées avec Kaltox® 6s et Oro® 7s en termes d'effets secondaires. Les effets secondaires ont été amoindris en Phase de pré-vulgarisation comparés aux résultats de la Phase II. Ceci serait dû pour la Phase de pré-vulgarisation à la taille des maisons qui sont légèrement plus grandes que le standard des cases expérimentales d'une part et, d'autre part, un meilleur système d'aération des chambres qui est différente de celle imposée par le dispositif des cases expérimentales. Il est à noter surtout que l'effectif était assez faible et probablement le protocole ne serait pas bien adapté pour tester la toxicité du produit chez les dormeurs. Nos résultats ne montrent qu'une tendance des effets secondaires observables.

Conclusions et Perspectives

Les résultats de la phase de pré-vulgarisation confirment ceux obtenus en phases I et II qui avaient déjà montré une efficacité supérieure de Kaltox® comparée à Oro® aux doses évaluées. En particulier, la dose de Kaltox® 6s a montré, à l'exception de l'effet dissuasif qui a été similaire pour les deux insecticides, que Kaltox® 6s présente toujours un avantage supérieur à celui de Oro® 7s et ce même dans les zones où *An. gambiae* présente une résistance aux pyréthriinoïdes utilisés en santé publique. Toutefois, les deux insecticides n'ont pas pu induire une mortalité supérieure ou égale à 80%, seuil de sensibilité opérationnelle. Les recherches devraient donc s'orienter vers la mise au point d'autres combinaisons d'insecticides afin d'améliorer l'efficacité des bombes aérosols et différer la résistance. D'autres investigations de grande envergure seraient également nécessaires pour mieux apprécier la tolérance humaine vis-à-vis de ces bombes aérosols.

Recommandations

En recommandation, en utilisation dans les conditions réelles, cet insecticide est recommandé en pulvérisation de 4 secondes pour les pièces de petit à moyenne taille (3,5×2×2 m) tandis que la dose de 6 secondes pourrait être utilisée dans les pièces relativement supérieures (4×3×3 m). Les doses pourraient être augmentées proportionnellement à la taille des maisons. Pour optimiser la lutte anticulicidienne, nous recommandons l'utilisation du Kaltox® en complémentarité avec les outils de LAV existant. Cette pratique serait souhaitable surtout aux heures où les usagers ne sont pas encore au lit et exposés aux piqûres.

Les résultats relatifs aux effets secondaires ont montré en phase de pré-vulgarisation que pour des maisons de taille supérieure à celle des cases expérimentales, ces effets secondaires ont été réduits probablement dus à un meilleur système d'aération des chambres qui est différent de celui imposé par le dispositif des cases expérimentales en conditions semi contrôlées. Il est donc fortement recommandé de respecter un temps d'après pulvérisation plus long avant l'installation dans les maisons lorsque celles-ci sont traitées avec Kaltox® et ce quelle que soit la dose afin de minimiser les effets secondaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rapport sur le paludisme dans le monde : 2011 (World Malaria Report 2011). Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 2011.
2. Elissa N., Mouchet J., Riviere F., Meunier Y., Yao K., 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med Trop*, 73: 2914.
3. Chandre F., Manguin S., Brengues C., Dossou Y., Darriet F., Diabaté A., *et al.*, 1999. Current distribution of a parathyroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parasitologia*, 41:319-322.
4. Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson S., Darriet F., Berge B., Devonshire L., *et al.*, 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 7:179-84.
5. Akogbeto M., Yakoubou S., 1999. Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthroïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull Soc Pathol Exot*, 92 : 123-30.
6. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Simard F., Ouédraogo J.B., *et al.*, 2004. First report of *kdr* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *J Am Mosq Control Assoc*, 20: 195-6.
7. Namountougou M., Simard F., Baldet T., Diabaté A., Gnankinié O., Ouédraogo J.B., *et al.*, 2012. Multiple Insecticide Resistance in *An. gambiae* s.l. population from Burkina Faso, West Africa. *PLoS ONE*, *in press*.
8. Djègbè I., Boussari O., Sidick A., Martin T., Ranson H., Chandre F., *et al.*, 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S *kdr* mutation in *An. gambiae* from West Africa. *Malaria Journal*, 10:261.
9. Corbel V., N'Guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., *et al.*, 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*, 101:207-216.
10. Tia E., Akogbeto M., Koffi A., 2006. Situation de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.s. (*Diptera : Culicidae*) aux pyrèthrinoïdes et au DDT dans cinq écosystèmes agricoles de Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*, 99(4) :278-82.
11. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Guiguemdé T.R., Darriet F., *et al.*, 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am Soc Trop Med Hyg*, 67(6):617-622.
12. Elissa N., Mouchet J., Riviere F., Meunier Y., Yao K., 1994. Sensibilité d'*Anophèles gambiae* aux insecticides en Côte d'Ivoire. *Sante*, 4:95-9.

13. N'Guessan R., Darriet F., Guillet P., Carnevale P., Traore L., Corbel V., *et al.*, 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol*, 17: 19-25.
14. Djogbéno L., Chandre F., Berthomieu A., Dabiré K.R., Koffi A., Alout H., *et al.*, 2008. Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS ONE*, 3: e2172.
15. Dabiré K.R., Diabaté A., Djogbenou L., Ouari A., N'Guessan R., Ouédraogo J.B., *et al.*, 2008. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malaria Journal*, 7:188.
16. Djogbéno L., Dabiré K.R., Diabaté A., Kengne P., Akogbéto M., Hougard J., *et al.*, 2008. Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 78: 298-302.
17. Guillet P., N'Guessan R., Darriet F., Traoré M., Chandre F., Carnevale P., 2001. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol*, 15(1):105-12.
18. Pennetier C., Costantini C., Corbel V., Licciardi S., Dabiré K.R., Lapied B., *et al.*, 2009. Synergy between Repellents and Organophosphates on Bed Nets: Efficacy and Behavioural Response of Natural Free-Flying *An. gambiae* Mosquitoes. *PLoS ONE*; 4(11): e7896.
19. Corbel V., Chabi J., Dabiré K.R., Etang J., Nwane P., Pigeon O., *et al.*, 2010. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet[®] 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. *Malaria Journal*; 9:113.
20. Pennetier C., Chabi J., Martin T., Chandre F., Rogier C., Hougard J.M., *et al.*, 2010. New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasites & Vectors*; 3:81.
21. Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Toé K., Ouari A., Kengne P., *et al.*, 2009a. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *R Soc Trop Med Hyg*, 103:1113-1120.
22. Diabaté A., Baldet T., Chandre C., Dabiré K.R., Kengne P., Guiguemdé T.R., *et al.*, 2003. *KDR* Mutation, a Genetic Marker to Assess Events of Introgression Between the Molecular M and S Forms of *Anopheles gambiae* (*Diptera* : *Culicidae*) in the Tropical savannah Area of West Africa. *J Med Entomol*, 40(2):195-198.
23. Harbach R., 1994. Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (*Diptera*: *Culicidae*): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull Entomol Res*, 84:331-42.

24. Fontenille D., Cohuet A., Awono P., Antonio C., Wondji C., Kengne P., *et al.*, 2003. Systématique et biologie des Anophèles vecteurs de *Plasmodiums* en Afrique, données récentes. *Med Trop*, 63:247-53.
25. Coetzee M., Fontenille D., 2004. Advances of in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol*, 34:599-605.
26. Akogbeto M., Romano R., 1998. Infectivité d'*Anopheles melas* vis à vis du *Plasmodium falciparum* dans le milieu côtier lagunaire du Benin. *Entomologie médicale*, Manuscrit n°1939.
27. Coz J., 1973. Contribution à la bioécologie du complexe *Anopheles gambiae* Gilies en Afrique Occidentale. *Cah ORSTOM, sér Ent Méd Parasitol*, 11:33-40.
28. Bryan J., 1982. *Anopheles gambiae* and *An. melas* at Brefet, the Gambia, and their role in malaria transmission. *Ann Trop Med Parasit*, 77:1-12.
29. Service M., Martin S., Invest J., 1977. *Anopheles moucheti* Evans as malaria vector in Gabon. *Cah O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Med. Et Parasitol.*, 15(3):263-264.
30. Njannloga A., Robert V., Toto J., Carnevale P., 1993. *Anopheles moucheti*, vecteur principal du paludisme au sud Cameroun. *Bull. liais. Doc. OCEAC*, 26(2).
31. Majori G., Sabatinelli G., Coluzee M., 1987. Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control. *Medical veterinary Entomol*, 1:185-192.
32. Petrarca V., Petrangeli G., Rossi P., Sabatinelli G., 1996. Antimalaria campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): the *Anopheles gambiae* complex in the city of Ouagadougou and surrounding villages. *Annali Dell Istituto Superior Di Sanita*, 22(1):189-191.
33. Pages F., Orlandi E., Corbel V., 2007. Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37:153-161.
34. Mittal K., 2003. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *J Vector Borne Dis*, 40:20-32.
35. Louis J., Albert J., 1988. Le paludisme en République de Djibouti; stratégie de contrôle par la lutte anti larvaire biologique par des poisons autochtones (*Aphaenurus dispar*) et toxines bactériennes. *Med Trop*, 48:127-31.
36. Lofgren C., Dame D., Breeland S., Weidhaas D., Jeffery G., Kaiser R., *et al.*, 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albanus* in El Salvador. III. Field methods and population control. *Am J Trop Med Hyg*, 23:288-97.
37. Carnevale P., Mouchet J., 1990. Vector control and malaria control. *Med Trop*, 50:391-8.

38. Anonyme. Indoor residual spraying. Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. WHO position statement. WHO/HTM/MAL/2006.1112.
39. Snow R., 1987. Bed-net and protection against malaria. *Lancet*, 27:1493-4.
40. Pietra Y., Procacci P., Sabatinelli G., Kumlien S., Lamizana L., Rotigliano G., 1991. Impact de l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine dans une zone rurale de haute transmission au Burkina Faso. *Bull Soc Path Exot*, 84(4) :375-85.
41. Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., *et al.*, 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*, 13:1-7.
42. Dong K., 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*, 27:93-100.
43. Verhaeghen K., Van W., Roelants P., Backeljau T., Coosemans M., 2006. Detection of the East and West African *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malar J*, 5:16.
44. WHO. 1996. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. Geneva: WHO Pesticide Evaluation Scheme, Division of Control of Tropical Diseases, World Health Organization, CTD/WHOPES/IC/96.1.
45. Dabiré K.R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Kengne P., Simard F., *et al.*, 2009b. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (*ace-1*) in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso (West Africa). *Tropical Med and International Health*, 14(4):396-403.
46. Gilies M., De Meillon B., 1968. The Anopheline of Africa south of the Sahara. *South Africa Institute of Medical Research Johannesburg, South Africa*.
47. WHO.1998. Comité d'experts du paludisme. Vingtième rapport. <http://www.Mosquito.who.net./docs/ecr20fr.htm>.
48. Beier J., Perkins P., Wirtz R., Koros J, Diggs D, Gargan T., *et al.*, 1986. Bloodmeal identification by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles (Diptera: Culicidae)* in Kenya. *J Med Ent*, 25:9-16.
49. Wirtz A., Burkot R., Graves M., Andre G., 1987. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) from Papua New Guinea. *J Med Ent*, 24(4):433-7.
50. Scott J., Brogdon W., Collins F., 1993. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 49:520-529.

51. Favia G., Lafronconti A., Spanos L., Sidén I., Louis C., 2001. Molecular characterization of ribosomal polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 10:19-30.
52. Dabiré K.R., Diabaté A., Baldet T., Toe L., Guiguemdé T.R., Ouédraogo J.B., *et al.*, 2006. Personal protection of long lasting insecticide-treated nets in areas of *Anopheles gambiae* s.s. resistance to pyrethrinoids. *Malaria Journal*, 5:12.
53. Diabaté A., Dabiré K.R., Heidenberger K, Crawford J, Lamp W., Culler L., *et al.*, 2008. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evolutionary Biology*, 8:5.
54. Baldet T., Diabaté A., Guiguemdé T.R., 2003. Etude de la transmission du paludisme en 1999 dans la zone rizicole de la Vallée du Kou (Bama), Burkina Faso. *Cahiers Santé*, 13 :55-60.
55. Robert V., Gazin P., Carnevale P., 1986. Malaria transmission in three sites surrounding the area of Bobo-Dioulasso (Burkina Faso): the savanna, a rice field, and the city. *Bull Soc Vet Ecol*, 12:541-543.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole des bioessais en tube OMS

Ce test a pour objectif d'évaluer la sensibilité d'une population cible de moustiques aux insecticides. Cette technique présente deux grandes étapes:

1. Préparations des papiers imprégnés

a. Principe de l'imprégnation

Le principe de l'imprégnation est basé pour le cas d'un papier à 1% sur la dissolution de 6,6 mg d'insecticide dans 1,3 ml d'acétone, auquel on ajoute 0,7 ml de silicone, ou prendre 1,3 ml d'une solution à 5,077 g/l d'insecticide dans l'acétone à laquelle on ajoute 0,7 ml de silicone (Réseau MIM/OMS/TDR).

b. Mode opératoire

- Inscrire sur la première face le nom de l'insecticide, la concentration et la date d'imprégnation
- Égoutter 2 ml de la solution d'imprégnation uniformément sur toute la deuxième surface du papier.
- Sécher le papier sur un grillage métallique pendant 24 heures. Une fois secs, les papiers sont emballés individuellement ou 5 par 5 dans une feuille d'aluminium et conservés au réfrigérateur 4°C (les papiers ne doivent pas être utilisés plus de 5 fois).

2. Test en tube OMS

Les tests sont réalisés dans le laboratoire de bioessai maintenu à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et avec une hygrométrie de 70-80%. Une température plus élevée entraîne une diminution de l'efficacité des pyréthriinoïdes pouvant conduire à une surestimation de la résistance.

a. Principe des tests en tube OMS

Le principe de cette technique est basé sur l'exposition d'une population ou d'une souche à un insecticide et le décompte des moustiques kd au cours de l'exposition et de la mortalité après 24 heures d'observation

b. Mode opératoire

- Placer les feuilles blanches normales (12 x15cm) dans les tubes verts fixés sur les tiroirs.
- Introduire 25 femelles dans les tubes verts à l'aide de l'aspirateur. Pour chaque insecticide, l'idéal est d'avoir 4 tubes de 25 pour l'exposition et 1 tube de 25 moustiques témoins.
- Placer les femelles en observation pendant une heure avant l'exposition pour contrôler qu'il n'y ait pas de mortalité suite au transfert, auquel cas les mortes sont remplacées.

- Placer les papiers imprégnés d'insecticide (manipulés avec des gants) dans les tubes rouges, après le tri des femelles.
- Fixer les tubes rouges sur les tiroirs, puis après ouverture de la tirette, les femelles sont soufflées délicatement mais le plus rapidement possible dans le tube rouge. Le tube vert est ensuite dévissé.
- Noter le nombre de moustiques kd à intervalle régulier au cours de l'exposition. Les temps d'observation se font généralement toutes les 10 minutes pendant l'heure de contact mais peuvent être plus courts si la souche est particulièrement sensible.
- Au bout d'une heure, les moustiques sont ré-transférés dans les tubes d'observation et laissés 24 heures avec un coton de jus sucré dans les mêmes conditions de température et d'humidité.
- Déterminer la mortalité 24 heures après l'exposition. Tout individu ayant 3 pattes ou moins sera considéré comme mort.
- Après les tests, les papiers imprégnés sont replacés dans leur emballage au frigo.
- Nettoyer les clips métalliques par trempage dans l'éthanol ou l'acétone. Les tubes, les tiroirs et les couvercles sont trempés au moins 24 heures dans une solution pour désinfection et décontamination en séparant les tubes rouges des tubes verts dans deux bacs différents. Au bout de 24 heures, le matériel est rincé, séché puis nettoyé une dernière fois avec l'éthanol.
- Conserver séparément les morts et les vivants dans des tubes contenant du gel du silice pour la PCR.

Annexe 2 : Protocole des ELISA-repas de sang

D'après Beier J *et al.*, (1986).

i. Préparer les Tampons

- Préparer le Tampon «Repas de sang» (à garder +4°C, 1 à 2 semaines)

Pour ½ litre :

- 2,5g de caseine dans 50 ml de NaOH 0,1N
- Faire bouillir jusqu'à totale dissolution
- Ajouter 450 ml de PBS
- Ajouter 0,025% Tween 20 (soit 125µl/ 1/2 l)
- Ajouter 0,05g Thiomerosal
- Ajouter 0,01g Phenol rouge
- Agiter 2 heures

- Préparer le Tampon citrate pH4

Pour 1 litre :

Acide citrique, 1 H₂O 11,77g

Hydroxyde de sodium 4,48g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution.

Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide chlorhydrique 1N.

Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

- ii. Préparer les témoins positifs : sang dilué au 1/100 en moyenne.

10µl de sérum d'espèce dans 1 ml de PBS (homme (10100), poulet (1/200), bœuf (10100), mouton (1/30), chèvre (1/30), porc (1/100), cheval (1/100), chien (1/100), rat,).

- iii. Sensibiliser les plaques

Mettre 50µl de solution de sang à tester par puits (un moustique par colonne).

- iv. Incubation 3 heures à la température de la pièce ou la nuit à +4°C

- v. Préparer les anticorps spécifiques d'espèce marqués à la peroxydase :

Reconstituer les IgG marquées selon la notice. Garder au congélateur.

Pour une plaque il faut :

50µl x 12 = 600µl (+50µl) = 650 µl de solution de chaque IgG marquées.

Dilution à faire (dilution à vérifier par un damier, fonction de la marque) :

| Homme | 1/1000 | 2 µl IgG | + 2 ml Tampon pour 3 plaques |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------------------------------|
| Bœuf | 1/1000 | 2 µl IgG | + 2 ml Tempon |
| Poule | 1/2000 | 1 µl IgG | + 2 ml Tempon |
| Mouton | 1/500 | 4 µl IgG | + 2 ml Tempon |
| Cheval | 1/1000 | 2 µl IgG | + 2 ml Tempon |
| Porc | 1/1000 | 2 µl IgG | + 2 ml Tempon |
| Chien | 1/1000 | 2 µl IgG | + 2 ml Tempon |
| Rat | 1/1000 | 2 µl IgG | + 2 ml Tempon |

vi. Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les sérums hétérologues au 1/1000 ème. Exemple : tube anti-homme : aux AC marqués anti-homme dans 4 ml Tempon : ajouter 4µl de sérum de bœuf + 4µl de sérum de poule + 4µl de sérum de mouton +4µl de sérum de cheval + 4µl de sérum de porc + 4µl de sérum de chèvre + 4µl de sérum de chien etc...(tous les autres sérums sauf Homme).

SAUF pour Mouton et chèvre : ne PAS mettre de sérum de mouton avec AC marqués anti-chèvre. Ne PAS mettre de sérum de chèvre avec AC marqués anti-mouton.

- vii. Laver 2 fois au PBS-Tween

- viii. Distribuer 50µl par puits de solution d'IgG marquées, mettre une IgG par rangée
- ix. Incubation 1 heure à RT sur la paillasse
- x. Vider la plaque. Laver 4 fois au PBS-Tween 20.
- xi. 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer le substrat de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

- 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- 30 ml de Tempon citrate
- 12µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30%).
- xii. Distribuer 100µl de substrat par cupule
- xiii. Incubation à l'obscurité, pendant 30 minutes (coloration bleue 620 nm)
- xiv. Blocage par 50µl d'acide sulfurique 4N : coloration jaune
- xv. Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur ELISA.

Annexe 3 : Protocole des ELISA-CSP

D'après Wirtz A., Burkot R., *et al.*, (1987).

1. Si nécessaire préparer les Tampons PBS – BB – Tween 20 - NP 40 +BB
2. Préparer les moustiques (Tête – Thorax dans tube numéroté)
 - Ajouter 20 µl de NP 40/BB. Laisser au moins 1H (ou la nuit au réfrigérateur)
3. Préparer le plan de la plaque sur la feuille (N° des moustiques, date, ...)
4. Broyer les moustiques : 2 fois 190 µl de BB (conservation des tubes à - 20°C)
5. Si nécessaire reconstituer les ACm de capture, garder à - 20°C
6. Sensibiliser les plaques ELISA
 - a. Préparer les solutions d'ACm de capture aux dilutions voulues : il faut faire les essais de dilution à chaque nouvelle commande
 - b. Vortexer

| Capture pour une plaque | | Pour 3 plaques | |
|-------------------------|----------------|----------------------|------------------|
| <i>P. falciparum</i> | 15 µl/5 ml PBS | <i>P. falciparum</i> | 45 µl/15 ml PBS |
| <i>P. vivax 210</i> | 5 µl/5 ml PBS | <i>P. vivax 210</i> | 15 µl/15 ml PBS |
| <i>p. vivax 247</i> | 10 µl/5 ml PBS | <i>p. vivax 247</i> | 30 µl/15 ml PBS |
| <i>p. malariae</i> | 60 µl/5 ml PBS | <i>p. malariae</i> | 180 µl/15 ml PBS |
| <i>p. ovale</i> | 15 µl/5 ml PBS | <i>p. ovale</i> | 45 µl/15 ml PBS |

- c. Mettre 50 µl/puits (à pipette 8 canaux, pte jaune) de chaque ACm de capture
 - Screen : mélange des *Plasmodiums* à tester (n x 50 µl)

- Mono spécifique : uniquement du *Plasmodium* étudié (1 x 50 µl)

Laisser la nuit sur la paillasse (ou le W.E. à 4°C).

7. Vider les plaques, ne pas laver
8. Mettre 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique)

Pendant 1H sur la paillasse.

Pendant ce temps faire decongeler les moustiques à tester (Tête, Thorax dans BB).

9. Vider les plaques, ne pas laver.
10. Mettre 50 µl du broyat de moustique par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit. Laisser pendant 2 H sur la paillasse.
11. Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les ACm conjugués, si nécessaire reconstituer le lyophilisat.
12. Vider la plaque. Laver 2 fois au PBS – Tween 20
13. Mettre 50 µ/puits de l'ACm conjugué, correspondant à l'ACm de capture (pour screen = 3 x 50 µl). laisser 1h sur la paillasse.

ACm conjugués à peroxydase dans BB, : il faut faire les essais de dilutoin à chaque nouvelle commande.

| Conjugués pour une plaque | | Pour 3 plaques | |
|---------------------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| <i>P. falciparum</i> | 7,5 µl/5 ml PBS | <i>P. falciparum</i> | 22,5 µl/15 ml PBS |
| <i>P. vivax 210</i> | 10 µl/5 ml PBS | <i>P. vivax 210</i> | 30 µl/15 ml PBS |
| <i>p. vivax 247</i> | 2 µl/5 ml PBS | <i>p. vivax 247</i> | 6 µl/15 ml PBS |
| <i>p. malariae</i> | 15 µl/5 ml PBS | <i>p. malariae</i> | 45 µl/15 ml PBS |
| <i>p. ovale</i> | 15 µl/5 ml PBS | <i>p. ovale</i> | 45 l/15 ml PBS |

14. Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le substrat de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

- 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
 - 30 ml de Tempon citrate
 - 12µl de H2O2 à 10% (ou 4 µl à 30% ou 6 µl à 20%).
15. Vider la plaque, laver 4 fois au PBS – Tween 20
 16. Mettre 100 µl/puits de substrat
 17. Incuber 30 minutes à l'obscurité sans toucher (coloration bleue 620 nm)
 18. Blocage par 50 µl d'acide sulfurique 4N : coloration jaune :
 19. Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur ELISA.

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN au CTAB, sur moustique entier

D'après Myriam., Cecile.,(2003).

1. Broyer chaque moustique dans 200 µl de CTAB 2%
2. Mettre au Bain-Marie 65°C pendant 5 minutes
3. Ajouter 200 µl de chloroforme – Mélanger par inversion
4. Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm, à TA
5. Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube
6. Ajouter 200 µl d'Isopropanol sur ce surnageant – Bien mélanger par inversion
7. Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm et TA
8. Vider l'Isopropanol. Bien égoutter et ajouter 200 µl d'Ethanol 70%
9. Centrifuger 5 minutes, 12 000, TA
10. Vider l'Ethanol
11. Sécher le culot 5 minutes maximum au speed – vac
12. Reprendre dans 20 µl d'H₂O – Ne pas vortexer – laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une ½ journée)

CTAB 2%

| Réactifs | Volume | Concentration finale |
|---------------------|--------|----------------------|
| 1 M Tris HCl pH 8.0 | 100 ml | 100 mM |
| 0.5 M EDTA | 20 ml | 10 mM |
| NaCl | 81.8 g | 1.4 M |
| CTAB* | 20 g | 2% |
| DdH ₂ O | QSP 1L | |

* Cetyl trimethyl ammonium bromide

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à TA.

Annexe 5 : Protocole de la PCR diagnostique d' *An. gambiae s.l.*

D'après Scott J., *et al.*, (1993).

Polymorphisme dans l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal.

Elle distingue en Afrique de l'ouest : *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*.

Amorces :

UN : GTGTGCCGCTTCCTCGATGT

AG : CTGGTTTGGTCGGCACGTTT

AA : AAGTGCCTTCTCCATCCTA

AM : GTGACCAACCCACTCCCTTGA

Conditions PCR

Avec la taq Quiagen (Cat, N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

| Réactifs | Concentration finale | Pour rxs à 25 µl |
|--------------------------------------------------------|----------------------|------------------|
| Tampon de Taq 10X contenant 15 mM MgCl ₂ | 1 x 1,5 mM | 2,5 µl |
| 5 mM dNTP | 0,2mM each | 1,0 µl |
| Primer UN (10 µM) | 5pmoles | 0,5 µl |
| Primer AG (10 µM) | 5pmoles | 0,5 µl |
| Primer AA (10 µM) | 5pmoles | 0,5 µl |
| Primer AM (10 µM) | 5pmoles | 0,5 µl |
| Taq DNA Polym (5U/µl) | 0,25U | 0,05 µl |
| ddH ₂ O | | 17,95 µl |
| DNA template (1 à 5ng/µl) | | 1,5 µl |

Amplification

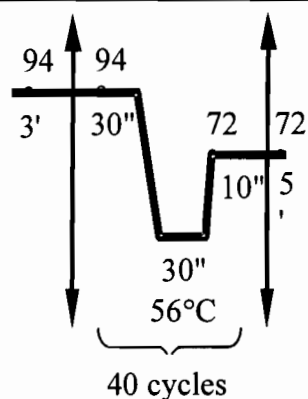
3' [30'', 30'', 10''] 40c 5'@56°C

Taille attendue

An. gambiae : 390 pb

An. arabiensis: 315 pb

An. melas: 464 pb



Annexe 6 : Protocole de la PCR diagnostique des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae s.s.*

D'après Favia G., *et al.*, (2001).

Polymorphisme d'un segment de l'espace inter génique (IGS) de l'ADN ribosomal.

Amorces :

R₃ : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R₅ : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

Conditions PCR

Avec la taq Quiagen (Cat, N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

| Réactifs | Concentration finale | Pour rxs à 25 µl |
|--------------------------------------------------------|----------------------|------------------|
| Tampon de Taq 10X contenant 15 mM MgCl ₂ | 1 x 1,5 mM | 2,5 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 1 mM | 1,0 µl |
| 5 mM dNTP | 0,2 mM each | 1.0 µl |
| Primer R ₃ (10 µM) | 7,5 pmoles | 0,75 µl |
| Primer R ₅ (10 µM) | 7,5 pmoles | 0,75 µl |

| | | |
|---------------------------|-----------|----------|
| Primer Mop int (10 µM) | 15 pmoles | 1,5 µl |
| Primer B/S int (10 µM) | 15 pmoles | 1,5 µl |
| Taq DNA Polym (5U/µl) | 0,25 U | 0,05 µl |
| ddH2O | | 14,45 µl |
| DNA template (1 à 5ng/µl) | | 1,5 µl |

Amplification

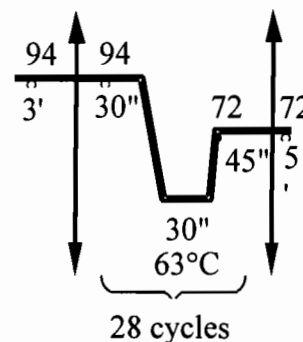
3' [30'', 30'', 45''] 28c 5' @63°C

Taille attendue :

R₃/ R₅ : 1300 pb

M : 727 pb

S : 475 pb



Annexe 7 : Protocole de la PCR diagnostique de la mutation *Kdr*

D'après Martinez-Torres D., *et al.*, (1998).

Polymorphisme dans un gène codant pour un canal à sodium associé à la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes.

Amorces :

D₁ : ATAGATTCCCCGACCATG

D₂ : AGACAAGGATGATGAACC

D₃ : AATTTGCATTACTTACGACA

D₄ : CTGTAGTGATAGGAAATTTA

Conditions PCR

Avec la taq Quiagen (Cat, N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

| Réactifs | Concentration finale | Pour rxs à 25 µl |
|--------------------------------------------------------|----------------------|------------------|
| Tampon de Taq 10X contenant 15 mM MgCl ₂ | 1 x 1,5 mM | 2,5 µl |
| 5 mM dNTP | 0,2mM each | 1,0 µl |
| Primer D ₁ (10 µM) | 6 pmoles | 0,6 µl |
| Primer D ₂ (10 µM) | 6 pmoles | 0,6 µl |
| Primer D ₃ (10 µM) | 20 pmoles | 2,0 µl |
| Primer D ₄ (10 µM) | 20 pmoles | 2,0 µl |
| Taq DNA Polym (5U/µl) | 0,25U | 0,05 µl |
| ddH2O | | 14,75 µl |
| DNA template (1 à 5ng/µl) | | 1,5 µl |

Amplification :

Taille attendue :

D₁/ D₂ : 293 pb

D₁/ D₃ : 195 pb

D₂/ D₄ : 137 pb

