

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPERIEUR

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-
DIOULASSO (UPB)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)



MINISTERE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET
DE L'INNOVATION

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE (CNRST)

INSTITUT DE RECHERCHE EN SCIENCES DE LA
SANTÉ

DIRECTION REGIONALE DE L'OUEST BOBO-
DIOULASSO (IRSS-DRO)



MEMOIRE

Présenté par
Koama BAYILI
(*Maître ès Sciences*)

Thème:

Evaluation de l'efficacité d'une moustiquaire bitraitée (Olyset Duo) sur les populations d'*Anopheles gambiae s.l* résistantes aux pyréthriinoïdes pour le contrôle du paludisme

Pour l'obtention du

Diplôme de Master II de recherche

Option : Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BAMSB)

Soutenu le 26 Mars 2015 devant le Jury:

Directeur de Mémoire :

Dr Abdoulaye DIABATE
Maître de Recherche

Co-Directeur :

Dr Moussa NAMOUNTOUGOU
Assistant en Biologie Appliquée

Président:

Pr Adrien Marie Gaston BELEM
Professeur Titulaire

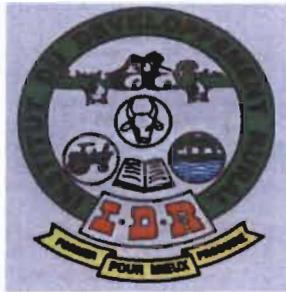
Membres:

Dr Abdoulaye DIABATE
Maître de Recherche
Dr Jean-Baptiste RAYAÏSSE
Chargé de Recherche

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPERIEUR

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-
DIOULASSO (UPB)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)



MINISTERE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET
DE L'INNOVATION

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE (CNRST)

INSTITUT DE RECHERCHE EN SCIENCES DE LA
SANTÉ
DIRECTION REGIONALE DE L'OUEST BOBO-
DIOULASSO (IRSS-DRO)



MEMOIRE

Présenté par
Koama BAYILI
(*Maître ès Sciences*)

Thème:

Evaluation de l'efficacité d'une moustiquaire bitraitée (Olyset Duo) sur les populations d'*Anopheles gambiae s.l* résistantes aux pyréthriinoïdes pour le contrôle du paludisme

Pour l'obtention du

Diplôme de Master II de recherche

Option : Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BAMSB)

Soutenu le 26 Mars 2015 devant le Jury:

Directeur de Mémoire :

Dr Abdoulaye DIABATE
Maître de Recherche

Co-Directeur :

Dr Moussa NAMOUNTOUGOU
Assistant en Biologie Appliquée

Président:

Pr Adrien Marie Gaston BELEM
Professeur Titulaire

Membres:

Dr Abdoulaye DIABATE
Maître de Recherche
Dr Jean-Baptiste RAYAISSE
Chargé de Recherche

DEDICACES

- A toute la famille **BAYILI** à Bastioua (Burkina Faso) et en Côte d'Ivoire;
- spéciale à mon père **Nakilou BAYILI** et à ma mère **Kagoua KANDO** sans lesquels, rien de ce qui a été fait n'aurait pu l'être;
- à ma bien aimée, **Chantal**, pour son soutien dans tous mes projets.

*A tous ceux qui ont perdu un proche,
à tous ceux qui souffrent,
à tous ceux qui souffrent de la souffrance d'un des leurs
à cause du Paludisme.*

REMERCIEMENTS

Dieu fait les choses bonnes en son temps et avec le concours des hommes

Ce travail n'aurait pu se concrétiser sans l'appui du **Projet SUMITOMO** et le concours de plusieurs personnes auxquelles j'ai le réel plaisir d'exprimer ma profonde gratitude. Je me dois de remercier:

Le **Docteur Jean-Bosco OUEDRAOGO** Directeur de recherche, Directeur de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé Direction Régionale de l'Ouest (IRSS-DRO), pour m'avoir accueilli au sein de son institut.

Le **Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO**, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso.

Le **Professeur Adrien Marie Gaston BELEM**, Directeur de l'école Doctorale des Sciences Naturelles et Agronomiques de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Président du Jury.

Le **Professeur Robert T. GUIGUEMDE**, Directeur de l'INSSA à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso.

Le **Docteur Roch K. DABIRE** Directeur de recherche, chef du département des maladies transmissibles du Centre Muraz pour son soutien énorme, ses conseils et ses enseignements ainsi que son accompagnement dans la réalisation de ce travail.

Le **Docteur Abdoulaye DIABATE**, Directeur de ce mémoire. Je vous serai toujours reconnaissant pour m'avoir accueilli et dirigé ce travail avec rigueur et disponibilité malgré vos multiples occupations. Je vous suis très reconnaissant pour cette initiation à la recherche et pour toutes les connaissances acquises auprès de vous. Vos connaissances scientifiques et vos qualités de chercheur nous ont permis de bénéficier largement de votre expérience dans le domaine de la recherche. Vous avez été plus qu'un modèle. Votre soutien a été inestimable dans la réalisation de ce travail. Que Dieu vous bénisse et vous fortifie davantage.

Le **Docteur Jean-Baptiste RAYAISSE** d'avoir accepté siégé dans le Jury.

Le **Docteur Lea PARE / TOE**, pour les différents conseils et encouragements.

Le **Docteur Zekiba TARNAGDA** responsable du laboratoire de biologie moléculaire de l'IRSS-DRO. Je vous exprime ma profonde gratitude pour vos conseils et vos encouragements.

A tout le corps professoral de l'école doctorale, au personnel de l'IRSS-DRO pour la formation reçue durant ces moments d'apprentissage.

Aux **Docteurs Simon SAWADOGO** et **Robert K. OUEDRAOGO**, pour leurs conseils, encouragements et suggestions pertinentes.

Au **Docteur Moussa NAMOUNTOUGOU** pour tout le temps consenti pour l'amélioration de la qualité rédactionnelle de ce mémoire. Que Dieu vous bénisse.

Tous les **Techniciens** de IRSS/ Centre Muraz en général et de l'Entomologie en particulier, **OUATTARA, SANOU, GUEL** et **ZOUNGRANA** pour tout le travail abattu sur le terrain comme au laboratoire. Que Dieu vous bénisse.

Tous mes grands frères, aînés scientifiques et camarades étudiants: **Hamidou MAIGA, François De Sales HIEN, Abdoulaye NIANG, Dr Fabrice SOME, Bienvenue YAMEOGO, Aristide HIEN, Abdoul Azize MILLOGO, Etienne BILGO, Yacouba CISSAO, Séverin SOMDA, Séverin NDO, Joseph BADO, Dieudonné SOMA, Serge PODA, Silvère Dieudonné ZAONGO, Roger SANOU** et **Rabila BAMOGO**. Je vous en suis très reconnaissant

A **ma Tantie, Madame TRAORE Brigitte** pour le matériel et les photocopies ainsi qu'à **Madame YAMEOGO Inès** pour toutes les formalités administratives qui ont facilité la réalisation de ce travail. Je vous en suis très reconnaissant.

A tous mes frères et amis, **Bazoma, Emmanuel, Jean Bali, Bouma, Bado, Drissa, Adama, Banhero, Raphaël, Moustapha, Sidibé, Gilbert, Ko et Bandé**, dont le soutien et les prières me restent importants.

Que toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail reçoivent ici ma profonde gratitude.

RESUME

La lutte anti-vectorielle est basée sur la pulvérisation intra-domiciliaire (PID) et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). Malheureusement l'émergence et la propagation de la résistance des vecteurs aux pyréthriinoïdes menacent sérieusement l'avenir de cette lutte. De nouvelles molécules/formulations d'insecticides ou des outils alternatifs visant à compléter ceux existants sont nécessaires. Le Pyriproxifène (PPF), un régulateur de croissance des insectes, réduit la fécondité et la fertilité des femelles des moustiques adultes.

La présente étude vise à étudier l'efficacité de la moustiquaire Olyset Duo imprégnée avec un mélange de pyriproxifène et d'un pyréthriinoïde en phase I et II sur les populations d'*Anopheles gambiae s.l.*, vecteur majeur du paludisme en Afrique subsaharienne.

L'efficacité en termes de mortalité, de la réduction de la fécondité et de fertilité de trois types de moustiquaires lavées ou non lavées (PPF, Olyset Duo et Olyset) a été testée en phase I au laboratoire en utilisant les souches de moustiques élevées à l'insectarium. Les mêmes moustiquaires ont été ensuite testées dans les cases expérimentales en phase II sur le terrain. Les mortalités enregistrées tant avec la moustiquaire Olyset Duo que Olyset en phase II restent faibles à modérées à l'avantage de la moustiquaire Duo (21% et 33%) mais fortes au laboratoire en phase I (80% et 100%) en test tunnel. Les protections individuelles en termes d'inhibition de piqûres conférées par les mêmes moustiquaires sont de l'ordre de 27% pour Olyset et 69% pour Olyset Duo sur le terrain. Une réduction importante de la fécondité et de la fertilité a été obtenue par la moustiquaire PPF et Olyset Duo, toutefois à l'avantage de la moustiquaire PPF (57% à 99%).

Olyset Duo a montré une mortalité et une protection personnelle supérieure à Olyset sur les populations d'*An. gambiae* résistantes aux pyréthriinoïdes. Le PPF a induit une stérilisation des moustiques gorgés survivants. Le mélange d'un pyréthriinoïde et du pyriproxifène pour l'imprégnation des moustiquaires peut être un potentiel outil de gestion de la résistance. Il peut aussi empêcher une sélection supplémentaire de la résistance aux pyréthriinoïdes.

Mots clés: *An. gambiae*, pyriproxifène, pyréthriinoïde, résistance, ovaires, fécondité, fertilité, inhibition.

ABSTRACT

Vector control is based on indoor residual spraying (IRS) and the use of insecticide-treated nets (ITNs). Unfortunately the emergence and spread of vector resistance to pyrethroid threaten seriously the future of this tool. Alternative insecticides or formulations or tools are urgently needed to complete existing ones. The Pyriproxyfen (PPF), an insect growth regulator, reduced fecundity and fertility of adult female mosquitoes.

The present study aims to investigate the effectiveness of the net Olyset Duo impregnated with a mixture of pyriproxyfen and a pyrethroid in phase I and II on populations of *Anopheles gambiae sl*, a major vector of malaria in sub-Saharan Africa.

The effectiveness in terms of mortality, the reduction of fecundity and fertility of three types of washed or unwashed nets (PPF, Olyset Duo and Olyset) was tested in phase I in the laboratory using mosquitoes reared in insectary. The same nets have been tested in the experimental huts in phase II on the field. Mortalities recorded with both, Olyset Duo and Olyset in phase II remain low to moderate for the benefit of the Duo net (21% and 33%) but strong in the laboratory phase I (80% and 100%) in tunnel test. Individual protections in terms of biting inhibition conferred by the same mosquitoes nets are in order 27% and 69% for Olyset net and Olyset Duo net on the field. A significant reduction in fecundity and fertility was obtained by the PPF net and Olyset Duo, however to the benefit of the PPF net (57% to 99%).

Olyset Duo showed high mortality and personal protection than Olyset on *An. gambiae* resistant to pyrethroids. PPF induced sterilizing effect on blood fed surviving mosquitoes. Mixing a pyrethroid and pyriproxyfen for treatment of nets can be a potential tool to manage resistance. It can also prevent further selection of phenotypes resistance to pyrethroids.

Key words: *Anopheles gambiae*, pyriproxyfen, pyrethroid, resistance, ovaries, fecundity, fertility and inhibition.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS.....	II
RESUME.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIERES	VI
SIGLES ET ABREVIATIONS	IX
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	X
LISTE DES ANNEXES	XIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : GENERALITES.....	3
I.1. Les vecteurs du paludisme	3
I.2. Cycle de reproduction et comportement des anophèles	4
I.3. La lutte anti-vectorielle	7
I.3.1. La méthode de lutte physique et ses limites	7
I.3.2. La lutte biologique contre les vecteurs et ses limites	8
I.3.3. La lutte chimique et ses limites	8
I.3.4. La lutte génétique.....	9
I.4. Les insecticides.....	10
I.4.1. Les Pyrèthri-noïdes.....	10
I.4.2. Les organochlorés	11
I.4.3. Les organophosphorés.....	11
I.4.4. Les carbamates.....	11
I.4.5. Le pyriproxyfène (Classe U).....	11

I.5. Mécanismes de résistance aux insecticides	12
I.5.1. Résistance métabolique.....	13
I.5.2. Résistance par modification de la cible.....	13
I.5.3. Mécanismes secondaires de la résistance.....	14
 CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	15
 II.1. Sites de l'étude.....	15
 II.2. Etude de l'efficacité des moustiquaires en phase I (laboratoire).....	15
II.2.1. Les souches utilisées.....	15
II.2.2. Temps de régénération.....	16
II.2.3. Impact du Pyriproxyfen sur le développement des ovaires d' <i>An. gambiae</i>	17
II. 2.4. Activité résiduelle des moustiquaires	18
 II.3. Etude de l'efficacité des moustiquaires en phase II (cases expérimentales).....	20
II. 3.1. Les moustiquaires utilisées	21
II.3.2. Collecte des moustiques et détermination des paramètres entomologiques.....	21
II.3.3. Bioessais	23
 II.4. Analyse des données.....	23
 CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	24
 III. 1. Résultats	24
III.1.1. Evaluation de l'efficacité des moustiquaires en phase I (laboratoire).....	24
III.1.1.1. Détermination du temps de régénération	24
III.1.1.2. Impact du PPF sur la reproduction des femelles.....	26
III.1.1.2.1. Impact sur la fécondité et la fertilité des femelles.....	26
III.1.1.2.2. Impact sur le développement physiologique des ovaires	28
III.1.1.3. Activités résiduelles des moustiquaires	30
III.1.2. Evaluation de l'efficacité des moustiquaires en phase II (cases expérimentales)	35
III.1.2.1. Détermination des paramètres entomologiques	35
III.1.2.2. Effet sur la fécondité et la fertilité des populations d' <i>An. gambiae s.l</i> collectées	36
III.1.2.3. Tests biologiques réalisés sur les moustiquaires dans les cases expérimentales.....	37
III.1.2.3.1. Mortalité.....	37
III.1.2.3.2. Fécondité et fertilité	38
 III.2. Discussion.....	40
III.2.1. Le temps de régénération.....	40
III.2.2. La mortalité	40
III.2.3. Impact du Pyriproxyfène sur la fécondité et la fertilité des moustiques	42

III.2.4. Impact du Pyriproxyfène sur le développement des ovaires	44
III.2.4. Place de la moustiquaire Olyset Duo dans le management de la résistance	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47
ANNEXES.....	I

SIGLES ET ABREVIATIONS

ace.1 :	Gène de résistance de l'acétylcholinestérase
Al. :	Collaborateurs
An:	<i>Anopheles</i>
ANOVA	Analyse of variance
CL :	Concentration létale
CNaVdp:	Canal Sodium Voltage dépendant
DDT:	Dichloro diphényl trichloroéthane
GABA :	Acide Gamma Aminobutyrique
IRS :	Indoor Residual Spraying
IRSS :	Institut de Recherche en Sciences de la Santé
ITN :	Insecticide Treated Net
J :	Jours
Kdr :	Knockdown résistance
LAV :	Lutte Anti-Vectorielle
MII :	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
MILDA :	Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PID :	Pulvérisation Intra Domiciliaire
PPF :	Pyriproxifène
RTS, S :	malaria vaccine candidate
VK :	Vallée du Kou
VK7 :	Vallée du Kou quartier N°7
VKper :	Vallée du Kou perméthrine résistante

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

Tableau I : Estimation du temps de régénération des moustiquaires PPF et Olyset Duo.....	25
Tableau II : Fécondité et fertilité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testé en cône à zéro, dix et vingt lavages manuels au laboratoire.....	34
Tableau III: Mortalité, inhibition du repas sanguin et dissuasion d' <i>An. gambiae s.l</i> collectés dans les cases au cours de l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires.....	36
Tableau IV: Fécondité et fertilité d' <i>An. gambiae s.l</i> gorgés survivants collectés dans les cases expérimentales de VK7 lors de l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires.....	37
Tableau V : Fécondité et fertilité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testé en cône sur les moustiquaires dans les cases expérimentales au début de l'évaluation.....	39
Tableau VI : Fécondité et fertilité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testé en cône sur les moustiquaires dans les cases expérimentales à la fin de l'évaluation.....	39

Liste des figures

Figure 1: Images des différents états de répletion.....	5
Figure 2: Image d'une spermathèque (tripet et <i>al.</i> , 2001).....	5
Figure 3: Cycle de développement des moustiques	7
Figure 4: Mécanismes de résistance aux insecticides (cedric, 2010).....	13
Figure 5 : Design du test en cône	17

Figure 6 : Design du test en tunnel.....	20
Figure 7 : Vue de face d'une case expérimentale et sa véranda piège	21
Figure 8: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu avant et à 1, 2, 3, 5, 7 jours après trois lavages successifs avec les échantillons d'Olyset Duo en cône et tube OMS.	24
Figure 9: Réduction de la fécondité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu nourris au sang mis en contact des échantillons PPF lavés trois fois en cône et tube OMS relatif aux contrôles.	25
Figure 10: Réduction de la fertilité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu nourris au sang mis en contact des échantillons PPF lavés trois fois en cône et tube OMS relatif aux contrôles.....	25
Figure11: Nombre moyen d'œufs (A) et de larves (B) par femelle des contrôles et des traitées au PPF durant les trois cycles de ponte	26
Figure 12: Nombre moyen d'œufs (A) et de larves (B) par femelle des contrôles et des traitées au PPF gorgées 4 jours après exposition	27
Figure 13: Nombre moyen d'œufs (A) et de larves (B) par femelle des contrôles et des traitées au PPF avant et après exposition.....	28
Figure 14: Ovaires des contrôles (A & B) et des traitées au PPF (C & D) 48 heures et 72 heures respectivement après repas de sang.	29
Figure 15: Ovaires des contrôles pondues (A) et des traitées non pondues ayant retenues leur œufs (B).....	29
Figure 16: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testé en cône et tube OMS avant le repas de sang.....	30
Figure 17: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu nourrit au sang avant les tests cône et tube OMS.....	30

Figure 18: Mortalité et inhibition du repas de sang en test tunnel d' <i>An. gambiae</i> VKper.....	31
Figure 19: Mortalité et inhibition du repas de sang en test tunnel avec <i>An. gambiae</i> VK.....	31
Figure 20: Réduction de la fécondité et de la fertilité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testé en cône et tube OMS avant le repas de sang comparativement aux contrôles.	31
Figure 21: Réduction de la fécondité et de la fertilité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu nourrit au sang avant les tests cône et tube OMS comparativement aux contrôles.....	31
Figure 22: Réduction de la fécondité et de la fertilité d' <i>An. gambiae</i> VKper en test tunnel comparée aux contrôles	32
Figure 23: Réduction de la fécondité et de la fertilité d' <i>An. gambiae</i> VK en test tunnel comparée aux contrôles	32
Figure 24 : Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu en test cône avec les échantillons de PPF et Duo a 0, 10 et 20 lavages manuels au laboratoire.....	33
Figure 25: Mortalité et inhibition du repas de sang d' <i>An. coluzzii</i> de l'insectarium en test tunnel avec les moustiquaires non lavées et lavées 20 fois.....	35
Figure 26: Réduction en fécondité et fertilité d' <i>An. coluzzii</i> de l'insectarium en test tunnel avec les moustiquaires non lavées et lavées 20 fois relatif aux contrôles.....	35
Figure 27: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testé en cône sur les moustiquaires dans les cases expérimentales au début et à la fin de l'évaluation.....	38

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Protocole de lavage des échantillons de moustiquaire.....	i
Annexe 2: Protocole du test en cône	iii
Annexe 3: Protocole de lavage manuel des moustiquaires entières pour les cases expérimentales.....	v
Annexe 4: Protocole du test en tunnel	vii
Annexe 5: Protocole d'évaluation des moustiquaires en cases expérimentales.....	ix

INTRODUCTION

Le paludisme demeure un problème de santé publique dans les régions tropicales. Il est à l'origine d'environ 198 millions de cas cliniques dans le monde dont 584 000 décès (WHO, 2014). Il est une maladie parasitaire causée par un protozoaire hématophage du genre *Plasmodium*. L'agent pathogène est transmis à l'homme lors de la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles* infecté. Cinq espèces de *Plasmodium* sont à l'origine du paludisme chez l'homme dont *P. falciparum* qui est responsable de la forme la plus sévère et de la plupart des décès dus à la maladie. En Afrique Sub-saharienne et en particulier au Burkina Faso, les espèces des deux complexes *An. gambiae* et *An. funestus* constituent les vecteurs majeurs du paludisme (Gillies et De Meillon, 1968; Fontenille *et al.*, 2003).

La lutte contre les vecteurs existait depuis la Grèce antique où certains aristocrates romains se retiraient en montagnes pendant l'été (qui rimait avec le développement de moustiques) pour éviter le paludisme. Grâce aux découvertes scientifiques, l'épidémiologie du paludisme a été mieux décryptée. De nos jours, la lutte contre le paludisme est considérée comme un des objectifs du Millénaire (WHO, 2012).

Aujourd'hui, les grands programmes de lutte contre le paludisme s'appuient sur le traitement des cas cliniques à base de molécules antipaludiques et sur la lutte anti-vectorielle. Le contrôle des vecteurs repose essentiellement sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides et la pulvérisation intra domiciliaire. Toutefois l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme à la plupart des molécules d'insecticides pourrait sérieusement affecter l'efficacité de cette intervention (WHO, 2009).

De nombreuses études ont montré une forte résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires (Diabaté *et al.*, 2002 ; N'guessan *et al.*, 2003 ; Tripet *et al.*, 2007; Dabiré *et al.*, 2007, 2008). Selon le rapport de l'OMS 2011, la résistance d'*Anopheles gambiae* aux pyréthrinoïdes a été signalée dans vingt-sept (27) pays en Afrique (OMS, 2011).

Face à cette généralisation de la résistance en Afrique (Ranson *et al.*, 2010) et au Burkina en particulier (Dabiré *et al.*, 2009), il est impératif de trouver des solutions alternatives et innovantes. Parmi les alternatives figurent la lutte génétique (l'utilisation des mâles stériles) (Fontenille et Simard, 2004; Catteruccia *et al.*, 2009; Klassen, 2009), la recherche d'un vaccin (RTS, S) qui est en phase expérimentale.

La résistance du vecteur majeur du paludisme *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes, principale classe d'insecticides homologués pour l'imprégnation des moustiquaires (WHO, 2007) représente une sérieuse menace pour les programmes de lutte anti-vectorielle basée sur cet outil. La recherche d'insecticides de remplacement ou de nouvelles formulations est devenue une priorité (WHO, 2013).

L'une des stratégies prometteuse pour prévenir ou retarder l'évolution de la résistance chez les vecteurs du paludisme est l'utilisation du pyriproxifène (PPF) (un analogue régulateur de croissance) ou en combinaison avec un pyréthrinoïde. Ce PPF incorporé dans les fibres de moustiquaire a montré une bonne efficacité au laboratoire en test tunnel en terme de réduction de la fécondité des moustiques (Rossignol *et al.*, 2011).

Notre étude a pour objectif général d'évaluer l'efficacité d'une moustiquaire bitraitée de perméthrine (2%) et du Pyriproxifène (1%) produite par Sumitomo chemical sur les populations d'*Anopheles gambiae s.l.* résistantes aux pyréthrinoïdes. Une comparaison sera faite avec la moustiquaire Olyset imprégnée de perméthrine (2%) et la moustiquaire PPF imprégnée de Pyriproxifène (1%) . Spécifiquement il s'agit de:

- mesurer l'efficacité des moustiquaires en phase I (laboratoire) à travers des analyses biologiques;
- tester l'efficacité des moustiquaires en phase II (cases expérimentales) à travers des paramètres entomologiques.

CHAPITRE I : GENERALITES

I.1. Les vecteurs du paludisme

Les anophèles sont des moustiques appartenant:

- Règne: animal;
- Sous règne : Métazoaires;
- Embranchement : Trachéates;
- Classe : Insectes;
- Sous classe : Ptérygotes;
- Ordre : Diptères;
- Sous ordre : Nématocères;
- Famille : *Culicidae*,
- Sous famille : *Anophelinae*;
- Genre : *Anopheles*.

Ce genre est responsable de la transmission du paludisme chez l'homme. Il existe 484 espèces d'anophèles (Harbach, 2004), mais seulement une soixantaine assure la transmission du paludisme dans le monde.

En Afrique tropicale, les principaux vecteurs responsables de la transmission du paludisme sont : *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus*, *Anopheles nili* et *Anopheles moucheti* considérés comme des vecteurs majeurs (Harbach, 1994; Hunt *et al.*, 1998; Cohuet *et al.*, 2003). A côté de ces vecteurs majeurs, on trouve des vecteurs secondaires ou locaux rencontrés surtout sur le littoral et le milieu insulaire tels qu'*Anopheles melas* sur les côtes lagunaires d'Afrique de l'Ouest, *Anopheles merus* en Afrique de l'Est et *Anopheles mascarensis* à Madagascar (Legoff *et al.*, 2003; Ravoahangimalala *et al.*, 2003; Dabiré *et al.*, 2007).

Au Burkina Faso, quatre vecteurs transmettent la quasi-totalité du paludisme : *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus* (Robert *et al.*, 1985; Diabaté, 2003). *An. gambiae* et *An. coluzzii* sont rencontrés et coexistent en proportions variables selon les conditions climatiques et écologiques du milieu (Della Torre *et al.*, 2001).

I.2. Cycle de reproduction et comportement des anophèles

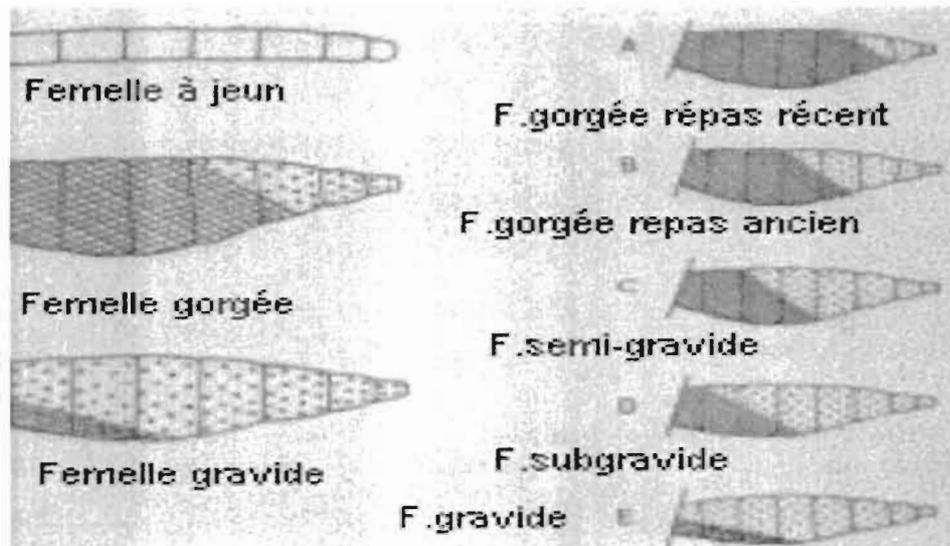
La femelle ne copule généralement qu'une seule fois dans sa vie. Normalement, elle ne prend son premier repas sanguin qu'après la copulation. Le premier lot d'œufs se développe après un ou deux repas sanguins (suivant les espèces).

Les habitudes de repos des moustiques après leur repas de sang sont d'une grande importance pour les programmes de contrôle et pour cette raison, elles doivent être bien maîtrisées. La plupart des espèces d'anophèles piquent la nuit. Certaines piquent au crépuscule (*An. gambiae*), d'autres piquent plus tard en milieu de la nuit ou même au petit matin. Certaines espèces entrent dans les maisons pour piquer (endophages), d'autres préfèrent piquer à l'extérieur (exophages).

Les préférences trophiques varient suivant les différentes espèces de moustiques. Certaines préfèrent prendre leur repas de sang sur l'homme plutôt que sur les animaux, elles sont appelées anthropophiles, tandis que celles qui préfèrent prendre leur repas de sang sur les animaux sont appelées zoophiles.

Au cours du repas de sang, l'anophèle peut prélever environ quatre fois le volume de son abdomen à vide. Après le repas de sang, la femelle se repose le plus souvent près du sujet sur lequel elle s'est nourrie. Le sang absorbé se concentre, devient noir et exsude les produits aqueux pendant 1 à 2 heures. Au cours de la digestion, les ovocytes grossissent et occupent la plus grande partie de l'abdomen qui paraît blanc par transparence. Il est facile de suivre à l'œil nu l'évolution de l'abdomen pendant la digestion du sang. Suivant leur état de réplétion nous pouvons distinguer : (Figure 1).

- Femelles à jeun ou non gorgées : femelles adultes n'ayant pas pris un repas de sang;
- Femelles gorgées : femelles ayant pris un repas de sang;
- Femelles semi-gravides : abdomen à moitié noirâtre contenant du sang en digestion, avec la partie apicale blanche due au développement des ovaires;
- Femelles gravides : femelles ayant développé des œufs conservés encore dans l'abdomen.



Source : <http://lozere.org/perso/malaria/Vecteur.htm>

Figure 1: Images des différents états de réplétion

Une fois à maturité, l'ovocyte est pondue. C'est au cours de la ponte, lors de son passage dans l'oviducte qu'il est fécondé par les spermatozoïdes stockés dans la spermathèque et devient un œuf (Clements, 1992).

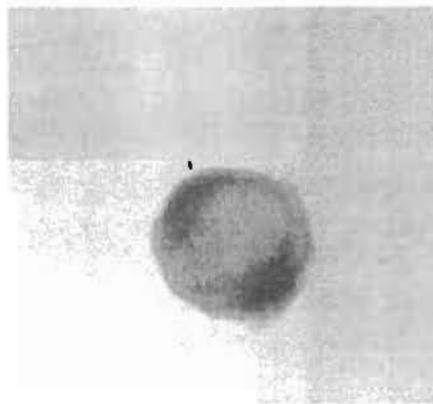


Figure 2: Image d'une spermathèque (Tripet et al., 2001)

Après la ponte, l'anophèle part à la recherche d'un nouveau repas sanguin.

Lors de cette prise de repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes du *Plasmodium* qui vont se développer dans l'estomac du moustique pour donner des sporozoïtes (cycle sporogonique). Ils seront injectés lors de la prochaine piqûre du moustique, faisant ainsi démarrer le cycle sporo-gamogonique chez l'homme. Le cycle chez le moustique dure en moyenne 12 jours.

Le cycle biologique débute après la prise d'un repas de sang sur un vertébré. Il se poursuit par la digestion du sang, la maturation des ovocytes, la recherche d'un site d'oviposition est dite

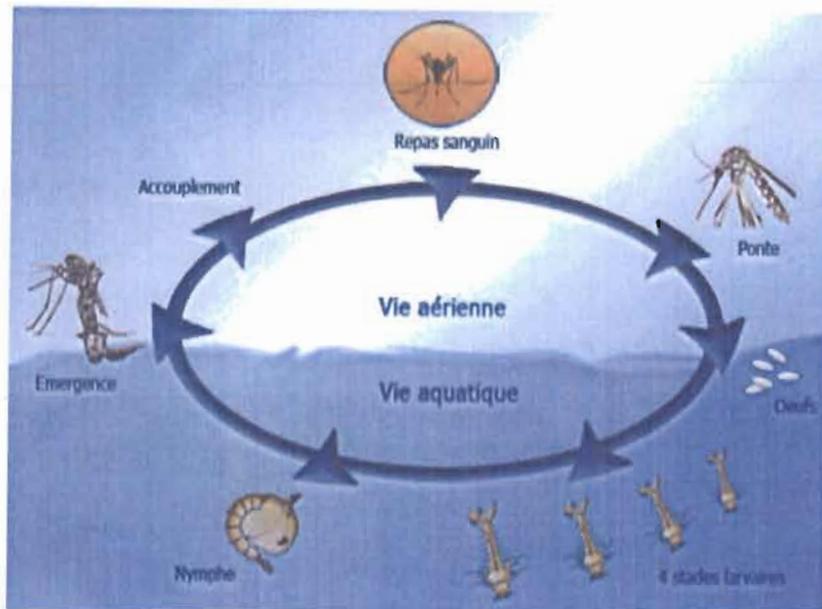
cycle gonotrophique (Clements, 1992). Dans les régions tropicales et subtropicales, ce cycle dure 48 à 72 heures selon les espèces et est fonction de la température.

Les anophèles femelles pondent leurs œufs sur l'eau. Ces œufs mesurent moins d'1 mm de longueur. Ils sont pondus isolément, munis de deux flotteurs latéraux remplis d'air leur permettant de rester en surface durant l'embryogénèse. La forme de l'œuf de l'anophèle évoque celle d'un cylindre incurvé aux extrémités, protégé par plusieurs enveloppes particulières qui, contrairement à d'autres espèces de moustiques, ne lui permettent toutefois pas de résister à la sécheresse. Les œufs éclos au bout de 24 à 48 heures selon la température (Holstein, 1949).

Après l'éclosion, la larve subit trois mues successives qui la conduisent du stade I au stade IV. Elle se compose de trois parties: la tête, le thorax et l'abdomen. A la fin du quatrième stade larvaire, la cuticule se fend dorsalement et libère une nymphe bien différente de la larve. La nymphe est une pupe mobile se présentant sous forme de virgule et ne se nourrit pas. Elle est composée de deux parties (le céphalothorax et l'abdomen).

La nymphe s'immobilise à la surface de l'eau, allonge son abdomen puis le moustique adulte (imago) sort. La durée totale du cycle, de l'œuf à l'imago est de douze (12) à vingt (20) jours en moyenne. Elle peut être réduite ou allongée par des conditions défavorables (Holstein, 1949).

Au cours de leur développement, toutes les espèces de moustiques sont caractérisées par la succession de deux phases: La première est aquatique et couvre la vie pré-imaginale, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'imago ou l'adulte.



Source: www.ilm.pf/infomoustiques

Figure 3: Cycle de développement des moustiques

I.3. La lutte anti-vectorielle

L'objectif principal de la lutte anti-vectorielle est de diminuer la morbidité et la mortalité palustre grâce à la diminution du taux d'inoculation entomologique. L'inoculation nécessite la présence du vecteur infecté. Les stratégies de lutte anti-vectorielle (LAV) visent la réduction, du contact homme vecteur, de la densité des vecteurs et la durée de vie des vecteurs adultes (OMS, 2004). Les stratégies de lutte anti-vectorielle peuvent être regroupées en deux groupes:

- La lutte anti-larvaire qui vise à réduire la densité des populations pré-imaginales et donc, la densité des adultes ;
- La lutte anti-adulte qui permet de réduire la densité des moustiques agressifs. Divers outils/approches sont utilisés à cet effet.

I.3.1. La méthode de lutte physique et ses limites

Cette méthode vise à détruire les gîtes larvaires ou les lieux de repos des adultes par l'assainissement et l'aménagement de l'environnement. En réalité, l'écologie du vecteur est étroitement liée à la présence d'eau. Les eaux stagnantes de surfaces générées par les activités de l'homme et les pluies sont des gîtes potentiels. La réduction du nombre de gîtes larvaires et la destruction des lieux de repos des adultes contribuent à diminuer la population vectorielle et donc la transmission du paludisme. La pose d'écrans aux ouvertures des habitations et aux avant-toits des habitats réduit efficacement le contact homme-vecteur. Ce type de contrôle

vectorel présente l'avantage d'être permanent (OMS, 2004), mais peine à avoir une bonne adhésion des populations et même des municipalités. Cependant, si l'ensemble de ces techniques de lutte étaient bien assimilées par la population, elles pourraient contribuer à la diminution de la transmission du paludisme.

En outre, ces outils de lutte sont très peu utilisés ou occasionnellement en complément à d'autres méthodes de lutte. La préférence d'autres méthodes de lutte par rapport à ces méthodes physiques (gestion des gîtes larvaires principalement) est due à deux entraves majeures: la difficulté d'implémentation et la pérennisation de l'intervention à cause de la complexité de l'opération d'une part, et le fait qu'un tel programme requiert une capacité technique pour l'implémentation et la surveillance des vecteurs d'autre part. Une faible adhésion des populations est également observée.

I.3.2. La lutte biologique contre les vecteurs et ses limites

La lutte biologique contre les vecteurs du paludisme repose sur l'utilisation des prédateurs ou des pathogènes des moustiques. On peut citer entre autres:

- Les insectes (des moustiques comme les Toxorhynchites), les hémiptères;
- Les Copépodes;
- Les poissons larvivores (*Gambusia affinis*, *Gambusia ajJinis*, *Poecilla reticulata*);
- Les champignons (*Lagenidium giganteum*, *Beauveria bassiana*).
- Les bactéries sporulantes appartenant au genre *Bacillus* (WHO, 1984): *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ou (Bti) et *Bacillus sphaericus*. Ces bactéries forment des spores et des toxines entomopathogènes puissantes et stables.

La lutte biologique n'a pas encore été appliquée à large échelle. Elle n'a pas eu d'effets remarquables dans les différents programmes de lutte anti-vectorelle. Elle est également incompatible avec les méthodes de lutte chimique. Pour son application, elle nécessite des connaissances assez profondes de la bio-écologie des vecteurs et du milieu.

I.3.3. La lutte chimique et ses limites

Elle est basée sur l'utilisation d'insecticide pour lutter contre les vecteurs du paludisme et les insectes nuisibles. Les insecticides les plus utilisés sont des insecticides chimiques: les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes et les régulateurs de croissance. Des toxines bactériennes (*Bacillus thuringiensis H-14* et *Bacillus sphaericus*) sont aussi utilisées (Fontenille et al., 2006). Les matériaux imprégnés d'insecticides (moustiquaires

imprégnées d'insecticides (MII), les bâches plastiques imprégnées d'insecticides à longue durée d'action, etc) et les Pulvérisations Intra-domiciliaires (PID) sont les principaux outils de cette lutte. Pour la lutte larvaire, des insecticides ont été répandus dans les gîtes larvaires.

De nombreuses études ont montré une baisse de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides en zone de forte résistance (Diabaté *et al.*, 2002 ; N'guessan *et al.*, 2003 ; Tripet *et al.*, 2007; Dabiré *et al.*, 2007, 2008). L'utilisation des MII peut induire un changement de comportement (exophilie) des vecteurs (Josyline *et al.*, 2009). Les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) peuvent se détériorer avant les 4 à 5 ans si elles ne sont pas bien utilisées et peuvent perdre leur rémanence (Smith *et al.*, 2007). Leur efficacité dépend aussi de plusieurs facteurs dont le climat, la démographie, le type de tissu et le produit pour l'imprégnation (Smith *et al.*, 2007).

En Afrique subsaharienne, la proportion des foyers qui possèdent au moins une MII a énormément progressé, passant de 10 % en 2005 à 53 % en 2011 (OMS, 2012). La proportion de la population dormant sous une moustiquaire est passée de 4 % à 33 % au cours de la même période (OMS, 2012). Toutefois, ces pourcentages n'ont pas varié depuis 2012 (53 % et 33 %), et sont nettement inférieurs au seuil fixé pour la couverture universelle (OMS, 2012).

Les PID rencontrent d'énormes difficultés qui sont de plusieurs ordres:

- La logistique qui est très lourde;
- la capacité technique d'implémentation et la surveillance des vecteurs;
- la toxicité pour l'homme, les animaux et l'environnement;
- la difficulté d'avoir une couverture à grande échelle;
- la difficulté liée à la gestion des déchets et d'adhésion des populations;
- l'accroissement de la résistance des vecteurs aux insecticides et la modification de leur comportement (exophilie) (Okumu *et al.*, 2010).

I.3.4. La lutte génétique

La lutte génétique (Fontenille & Simard, 2004; Catteruccia *et al.*, 2009; Klassen, 2009) repose sur la propagation de génération en génération de facteurs défavorables à la survie de l'espèce. Une des techniques conventionnelles est l'induction de la stérilité sexuelle par irradiation ou par utilisation de produits chimiques stérilisants chez les mâles. Il ya aussi l'introduction d'un transgène dans le génome du moustique dirigé contre le chromosome X du mâle ce qui fait que les gamètes mâles sont non viables. L'irradiation ou l'utilisation des

produits chimiques stérilisants peuvent inhiber complètement la production de gamètes chez les insectes (LaChance, 1967). Cependant en termes de réduction de la population cible, aucun de ces essais n'a été un réel succès. Les raisons peuvent être expliquées par une mauvaise irradiation, une perte d'aptitude des mâles à copuler après un trop long séjour au laboratoire, une non compétitivité dans les conditions naturelles ou une utilisation de souche de moustique très éloignée de la souche de terrain.

Plusieurs mécanismes éventuels ont été proposés pour le contrôle génétique des insectes vecteurs, mais le lâcher des mâles stériles semble être le plus avancé techniquement. Quant à l'utilisation des moustiques transgéniques, elle est au stade expérimental, même si quelques lâchers de mâles transgéniques stériles dans la nature ont eu lieu récemment (Medlock *et al.*, 2009). Une approche similaire à l'approche transgénique est en plein essor et est connue sous l'appellation « paratransgénèse ». C'est par exemple l'utilisation des bactéries pour le contrôle des vecteurs (Michael *et al.*, 2005; Aida *et al.*, 2013).

I.4. Les insecticides

De nombreuses molécules sont utilisées pour combattre les vecteurs de maladies et les nuisants mais surtout les ravageurs des cultures. Ces molécules sont principalement regroupées en 4 grandes familles chimiques (les pyréthriinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates).

I.4.1. Les Pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs du chrysanthème *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Ces extraits exercent sur les insectes un effet rapide parfois réversible appelé effet « Knock Down » (effet KD). Les pyréthriinoïdes agissent sur le système nerveux central et périphérique en modifiant les caractéristiques électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant CnaVdp. Ces canaux une fois activés (c'est-à-dire en position ouverte), entraînent un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation de la membrane cellulaire provoque l'activation du CnaVdp situé à proximité et de proche en proche engendrant une vague de dépolarisation assurant la propagation de l'influx nerveux (Chapman, 1969). Les pyréthriinoïdes ont un large spectre d'action. Ils ont été longtemps utilisés comme ingrédients dans la constitution des aérosols à usage domestiques contre les insectes.

I.4.2. Les organochlorés

Ces insecticides sont issus de l'industrie du chlore. Le vocable organochloré se réfère aux molécules comme le DDT et ses analogues, le lindane et les cyclodiènes. Ils sont ainsi subdivisés en fonction de leur structure chimique et de leur mode d'action. Ces molécules agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Le DDT agit à la fois sur le système nerveux périphérique et central en modifiant les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques des protéines des canaux sodium voltage dépendant. Il exerce sur les insectes un effet KD comme les pyréthriinoïdes. Les organochlorés tuent généralement par contact mais peuvent agir par absorption et dans quelques cas comme les fumigants.

I.4.3. Les organophosphorés

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique. Ils peuvent être classés en deux grands sous-groupes: les insecticides exothérapeutiques (le parathion, le malathion etc), pénètrent directement dans l'organisme des insectes par des voies diverses et les insecticides endothérapeutiques ou systématiques qui ont la particularité de pénétrer dans les végétaux en les rendant toxiques pour les insectes qui les consomment. La fixation des organophosphorés (qui sont actifs après oxydation) sur l'acétylcholinestérase entraîne l'accumulation d'acétylcholine dans la jonction synaptique. Lorsque sa concentration devient trop forte, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte, entraînant la paralysie puis la mort de l'insecte.

I.4.4. Les carbamates

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. Ces molécules sont aussi des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ils agissent directement sans oxydation préalable. A cause de leur toxicité souvent très élevée vis-à-vis des mammifères, ils sont moins utilisés en santé publique.

I.4.5. Le pyriproxifène (Classe U)

Le pyriproxifène de formule chimique (4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether) est un analogue d'hormone juvénile (type juvénoïde). Son action provoque un déséquilibre profond du système hormonal de l'insecte qui se traduit par une inhibition du développement de la morphogenèse, de l'embryogenèse et des baisses importantes de la fécondité et fertilité

des adultes (Ishaaya et Horowitz, 1992; WHO, 2000). Ce composé présente une très faible toxicité sur les mammifères avec une DL50 pour le rat par ingestion supérieure à 5000 mg/kg (Tomlin, 2000).

Des études de laboratoire ont permis d'établir la sensibilité de différentes espèces de moustiques à ce composé. La concentration létale 95 (CL95) qui prend en compte la mortalité des larves, des nymphes et des adultes à l'émergence s'est chiffrée à 0,017 mg/L pour *An. quadrimaculatus*, 0,0026 mg/L pour *Ae. aegypti* et de 0,00032 mg/L pour *Cx. tarsalis* (Estrada et Mulla, 1986). Sur *Ae. aegypti*, cet inhibiteur de croissance a montré qu'il agissait également à des concentrations très faibles (CL50 = 0,00011 mg/L et CL95 = 0,00032 mg/L) (Darriet et al., 2006). Les tests de sensibilité réalisés sur différentes souches de moustiques n'ont pour l'instant pas révélé de résistance croisée avec les insecticides pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamates.

Par ailleurs, le pyriproxifen est recommandé par l'OMS pour lutter contre les larves de moustiques à des concentrations comprises entre 0,02 et 0,05 mg/L (5 à 10 g/ha) avec un temps d'activité de 6 semaines (WHO, 2001, 2006). Le pyriproxifen ne pose pas de problème de toxicité, ni sur l'homme ni sur les animaux (Najera et Zaim, 2002).

I.5. Mécanismes de résistance aux insecticides

Le terme 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 ». Tous les êtres vivants possèdent des mécanismes de défense qui les protègent contre les effets néfastes de substances exogènes. Si une substance toxique entre dans un organisme plus rapidement qu'elle ne peut être éliminée, elle s'accumule au niveau de son site d'action jusqu'à atteindre une concentration létale.

Les principaux mécanismes de résistance peuvent être classés en trois (3) catégories:

- La résistance métabolique ;
- La modification de la cible ;
- Les mécanismes secondaires de la résistance.

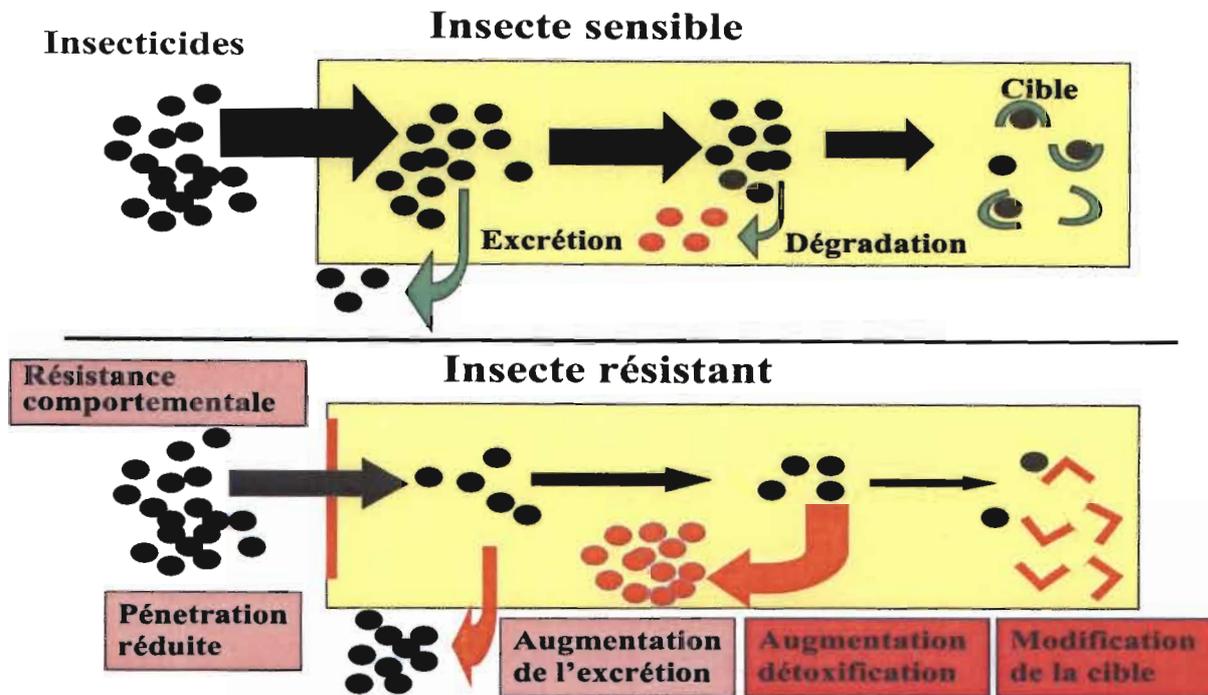


Figure 4: Mécanismes de résistance aux insecticides (Cedric, 2010)

I.5.1. Résistance métabolique

La résistance métabolique correspond à un accroissement des processus de dégradation qui interviennent dans le métabolisme normal des insecticides. Elle est aussi un mécanisme très efficace qui serait à l'origine de l'augmentation de l'activité catalytique et/ou de la quantité d'enzymes produites. Ces enzymes dégradent les insecticides en molécules non toxiques ou moins toxiques. Parmi les enzymes qui interviennent, nous pouvons citer les estérases, les monooxygénases à cytochrome P450 et les glutathion-S-Transférases.

I.5.2. Résistance par modification de la cible

Cette résistance est une mutation au niveau de la cible chez l'insecte conférant souvent des phénomènes de résistance croisée à tous les insecticides agissant sur la même cible. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux, acétylcholinestérase, canal Sodium voltage dépendant (CNaVdp), récepteur GABA. Toute modification structurale diminuant leur affinité vis-à-vis des insecticides peut induire une résistance.

Les mutations *Ace.1^R*, *Rdl* et *Kdr* sont des mécanismes majeurs de résistance aux insecticides. L'exposition d'une souche sensible d'insectes à un pyréthrianoïde entraîne une paralysie très rapide (effet Knock Down). La mutation *Kdr* est une mutation ponctuelle résultant du remplacement de la Leucine par la Phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine

Il du gène codant pour le CNaVdp. Elle confère la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT en Afrique (Dong, 1986).

La mutation Ace.1^R est la cible des insecticides organophosphorés et carbamates chez *An. gambiae s.l.* (Weill et *al.*, 2003, 2004).

I.5.3. Mécanismes secondaires de la résistance

Il s'agit de mécanismes peu connue dont l'efficacité est relativement moindre, comme la pénétration réduite de l'insecticide à travers la cuticule de l'insecte et les comportements d'évitement. Ces mécanismes peu étudiés interviennent souvent en synergie avec les mécanismes précédents.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Sites de l'étude

L'étude a été menée au laboratoire (phase I) et dans les cases de la station expérimentale de VK7 à la Vallée du Kou (phase II). La Vallée du Kou est située à une trentaine de kilomètres au Nord-ouest de Bobo-Dioulasso (Sud-ouest du Burkina Faso) à 4°24'42' de longitude Ouest et 11°23'14' de latitude Nord. Le site dispose d'une aire rizicole irriguée de 1200 ha aménagée depuis 1972 et regroupe sept villages. En raison de l'irrigation, les rizières offrent aux moustiques des gîtes de développement larvaire hautement productifs et quasi permanents.

La transmission du paludisme à Bama (Vallée du Kou) est assurée par le complexe *An. gambiae* et accessoirement par *An. funestus* (Robert *et al.*, 1985; Baldet *et al.*, 2003). La distribution des espèces du complexe *An. gambiae* est sujette à une dynamique spatio-temporelle avec une prédominance de l'espèce *An. coluzzii* toute l'année (Diabaté *et al.*, 2003). Dans cette zone, la résistance d'*An. coluzzii* aux pyréthrinoïdes et au DDT a été observée et s'est généralisée à toutes les classes d'insecticides avec une fréquence très élevée de la mutation *Kdr* L1014F (Namountougou *et al.*, 2012).

II.2. Etude de l'efficacité des moustiquaires en phase I (laboratoire)

Les tests biologiques menés au laboratoire permettent de déterminer l'efficacité des moustiquaires imprégnées et d'estimer le temps de rémanence des produits chimiques utilisés. Ils aident à étudier l'efficacité de l'insecticide dans les fibres en fonction du nombre de lavage.

II.2.1. Les souches utilisées

Au cours de cette évaluation deux souches de moustiques ont été utilisées : *An. gambiae* kisumu la souche sensible de référence aux insecticides et *An. coluzzii*, une souche résistante aux pyrethrinoïdes récemment colonisée en provenance de la Vallée du Kou.

Ces souches sont maintenues en insectarium à l'IRSS. Les larves de ces souches sont nourries en routine avec des croquettes de chat et élevées dans les conditions de Température = $27 \pm 2^\circ\text{C}$, d'Humidité Relative maintenue à $80 \pm 10\%$ en moyenne et d'alternance jour/nuit de 12h.

Avant l'utilisation des moustiques, nous avons pris le soin de vérifier leur insémination. Les spermathèques de dix (10) femelles de la case à utiliser ont été disséquées sous une loupe binoculaire et l'insémination a été lue au microscope à l'objectif 20x.

II.2.2. Temps de régénération

Le temps de régénération est le temps nécessaire à un insecticide incorporé dans des fibres de tissu de revenir en surface après un ou plusieurs lavages (WHO, 2006).

Pour déterminer la période requise de régénération des moustiquaires PPF et Olyset Duo, des échantillons de chaque type ont été lavés 3 fois successivement à la machine selon le procédé standard de l'OMS (WHO, 2006) (annexe I). Après les 3 lavages, des tests biologiques (cône et tube OMS) ont été réalisés sur les échantillons à 1, 2, 3, 5 et 7 jours et aussi à 0 lavage avec *An. gambiae* kisumu. Plusieurs paramètres entomologiques ont été mesurés : i) la mortalité induite par Olyset Duo ; ii) la réduction de la fécondité et fertilité induites par le PPF.

Le test en cône permet d'évaluer au laboratoire l'efficacité et la rémanence d'un insecticide sur un substrat donné. C'est également une méthode appropriée pour tester la résistance au lavage de formulation insecticide sur différents types de substrats. Les tests ont été réalisés selon la procédure recommandée par l'OMS (WHO, 2005).

Les moustiques femelles âgés de 3 à 5 jours sont introduits à raison de 10 par cône au contact de la moustiquaire pour 3 min. Dix (10) répliques ont été réalisées pour chaque type de moustiquaire (soit 100 moustiques/moustiquaire).

A l'issue des 3 min de contact les moustiques sont retirés des cônes et mis dans des gobelets recouverts de tissus moustiquaires neutres puis placés en observation pendant 24 h dans les conditions de laboratoire ($80\pm 10\%$ d'humidité et $27\pm 2^\circ\text{C}$). A 24 h après la phase d'observation, les vivants et les morts sont comptés pour la détermination de la mortalité (annexe II).

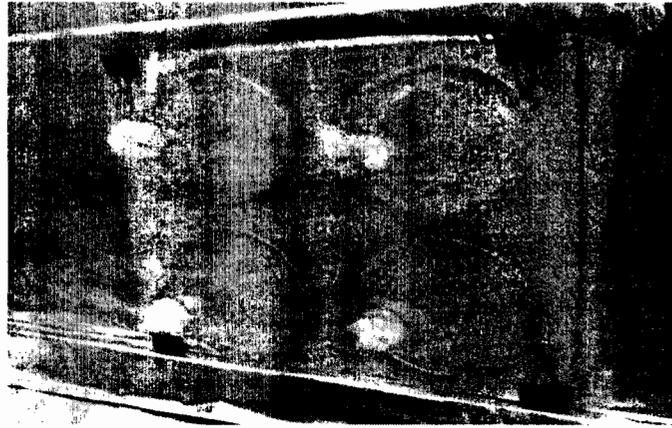


Figure 5 : Design du test en cône

II.2.3. Impact du Pyriproxyfen sur le développement des ovaires d'*An. gambiae*

Tous les moustiques survivants 24 heures après contact avec la moustiquaire sont nourris au sang sur un lapin pour des pontes. Vingt-quatre (24) heures après le repas de sang, les moustiques sont mis en ponte individuelle ou groupés dans des gobelets ou de petites cages bien étiquetés (références du moustique) contenant un papier filtre mouillé pour collecter les œufs. Après chaque ponte, les œufs sont comptés sous une loupe binoculaire à l'aide d'un compteur. Le nombre total d'œufs est noté avec les références du moustique sur la fiche de fécondité et de fertilité. Après comptage, les œufs sont soigneusement replacés dans leurs gobelets d'origine auxquels on ajoute un peu d'eau (110 à 125mL) pour favoriser leur éclosion. Deux à trois jours après la mise en éclosion, les larves éclos sont nourries légèrement dans chaque gobelet avec de la TetraMin® baby fish ou croquette de chat. Cinq à six jours après la mise en éclosion, les larves de stade L2 sont comptées à l'œil nu à l'aide d'une pipette et d'un compteur. Le nombre de larves est noté sur la fiche de fécondité et de fertilité suivant les références de chaque moustique inscrit sur le gobelet et sur la fiche. Le nombre total d'œufs pondus par moustique ainsi que le nombre total de larves éclos par moustique ont permis de mesurer deux paramètres: la fécondité et la fertilité des moustiques:

- la fécondité se rapportant au nombre d'œufs pondus par les femelles gorgées;
- la fertilité étant le décompte des œufs ayant éclos.

La réduction de la fécondité et de la fertilité a permis de mesurer l'efficacité des moustiquaires traitées en terme de stérilisation. Elle se calcule comme suit:

- réduction en fécondité = $((O_c - O_t) / O_c) * 100$ avec O_c = nombre moyen d'œufs par femelle gorgée survivante des contrôles; O_t = nombre moyen d'œufs par femelle gorgée survivante des traitées;
- réduction en fertilité = $((L_c - L_t) / L_c) * 100$ avec L_c = nombre moyen de larves par femelle gorgée survivante des contrôles; L_t = nombre moyen de larves par femelle gorgée survivante des traitées.

Pour mesurer l'impact du Pyriproxyfen sur le développement des ovaires, des femelles adultes d'*An. gambiae* Kisumu âgées de 4 jours maintenues à l'insectarium à l'IRSS/Centre Muraz ont été utilisées. Le test en cône OMS à 3 min de contact a permis de mettre un lot de moustiques en contact avec un échantillon de moustiquaire imprégné de pyriproxyfen. Un autre lot utilisé comme contrôle a été aussi mis en contact avec un échantillon de moustiquaire neutre. Trois différentes expériences ont été réalisées:

- i) Les femelles utilisées sont nourries au sang 24 heures après exposition et mises en ponte dans des petites cages (15x15x15 cm) munies de pondoirs pour collecter les œufs. 72 heures après ponte, les femelles ayant survécu sont nourries à nouveau au sang pour un autre cycle de ponte. Les femelles ont été ainsi traitées trois fois;
- ii) Après exposition, les femelles sont transférées dans les petites cages et nourries au glucose 5% pendant 4 jours puis nourries au sang au cinquième jour. Elles sont ensuite mises en ponte dans les petites cages munies de pondoirs;
- iii) Les femelles sont nourries au sang, pondues avant d'être exposées au PPF. Vingt-quatre (24) heures après exposition, elles sont à nouveau nourries au sang et mises en ponte dans les petites cages.

Les œufs et les larves sont comptés afin de déterminer la fécondité et la fertilité des moustiques.

Vu les réductions observées au niveau de la fécondité et de la fertilité des traités par rapport aux contrôles, nous avons disséqué des ovaires de certaines femelles 72 heures après le repas de sang et aussi après ponte sous une loupe binoculaire. Des photos ont été réalisées (figures 14 et 15).

II. 2.4. Activité résiduelle des moustiquaires

Les tests de résistance au lavage ont pour but de mesurer la bio disponibilité d'un insecticide après plusieurs lavages. Les moustiquaires entières ont été lavées 20 fois en tenant compte de leur temps de régénération. Une méthode de lavage manuel proche de celle standardisée avec

la machine a été développée (annexe III). Les moustiquaires ont été lavées au laboratoire manuellement avant d'être transportées dans les cases expérimentales de VK7 pour être testées. Ainsi vingt (20) lavages ont été réalisés avec un intervalle de trois (03) jours comme temps de régénération pour les moustiquaires traitées au PPF et les moustiquaires Olyset Duo et sept (07) jours pour les moustiquaires Olyset. Des tests en cône et en tunnel ont été réalisés sur des échantillons de ces moustiquaires suivant le nombre de lavage (0, 10 et 20 lavages) dans les conditions de laboratoire avec *An. gambiae* Kisumu et *An. coluzzii* en élevage à l'insectarium.

La mortalité, la réduction en fécondité et fertilité ont été mesurées ainsi que l'inhibition du repas de sang à l'aide des tests en tunnel.

Le test en tunnel a pour but d'évaluer l'impact des moustiquaires imprégnées d'insecticides sur des moustiques adultes dans des conditions de laboratoire simulant celles du terrain. Les tests ont été réalisés selon la procédure recommandée par l'OMS (WHOPES, 2005).

Le tunnel (60cm de long) est divisé en deux compartiments séparés aux deux tiers de sa longueur par des rails en aluminium. Une fente sur la partie supérieure du tunnel permet de glisser le cadre en carton sur lequel s'agrafe l'échantillon de moustiquaire. L'échantillon de moustiquaire à tester agrafé sur le cadran du carton est troué de 9 trous d'un centimètre de diamètre. Les extrémités du tunnel sont fermées par des tulles moustiquaires.

Les femelles de moustiques d'*An. gambiae* VKPer, *An. coluzzii* de l'insectarium et *An. gambiae* VK du terrain, âgées de 4 à 5 jours n'ayant jamais pris de repas de sang ont été utilisées. Les moustiques sont lâchés dans les grands compartiments des tunnels séparés des petits compartiments contenant les cobayes immobilisés, par les échantillons de moustiquaire à partir de 18 heures et ne sont retirés que le lendemain à 8 heures (annexe IV). Les moustiques vivants sont mis dans des gobelets et placés en observation pendant 24 heures pour évaluer la mortalité différée.

A l'issue des 24h d'observation, les moustiques gorgés vivants sont placés individuellement dans des gobelets pour la ponte afin de déterminer la fécondité et la fertilité.





Figure 6 : Design du test en tunnel

II.3. Etude de l'efficacité des moustiquaires en phase II (cases expérimentales)

Les cases expérimentales permettent d'étudier l'efficacité de différents types d'insecticides ou de moustiquaires grâce à l'évaluation des paramètres entomologiques suivants: l'inhibition du repas de sang, la dissuasion, l'induction d'exophilie et la mortalité sur les moustiques sauvages en vol libre. Ces cases sont caractérisées par la présence des rigoles contenant de l'eau pour éviter l'invasion des fourmis. Elles sont aussi caractérisées par la présence des chicanes sous forme de fenêtres par lesquelles entrent les moustiques et de véranda piège pour mesurer l'exophilie.



Figure 7 : Vue de face d'une case expérimentale et sa véranda piège

Quatre (04) types de moustiquaires développées par Sumitomo Chemical ont été testés au cours de notre travail.

L'évaluation des moustiquaires s'est déroulée d'août 2013 à novembre 2013 dans les cases expérimentales de VK7. Sept moustiquaires ont été utilisées dans 7 cases expérimentales :

- moustiquaire Olyset Duo (S-4092) imprégnée à la fois avec de la perméthrine (2%) et du Pyriproxifène (1%) non lavée;
- moustiquaire Olyset Duo (S-4092) imprégnée à la fois avec de la perméthrine (2%) et du Pyriproxifène (1%) lavée vingt (20) fois;
- moustiquaire PPF (S-4224) imprégnée avec du Pyriproxifène (1%) non lavée
- moustiquaire PPF (S-4224) imprégnée avec du Pyriproxifène (1%) lavée vingt (20) fois;
- moustiquaire Olyset imprégnée avec de la perméthrine (2%) non lavée;
- moustiquaire Olyset imprégnée avec de la perméthrine (2%) lavée 20 fois;
- la moustiquaire neutre (non imprégnée) a servi de contrôle négatif.

Chaque moustiquaire a fait 7 jours dans chacune des sept cases suivant un ordre de rotation "Latin square" (annexe V).

II.3.2. Collecte des moustiques et détermination des paramètres entomologiques

Chacune des moustiquaires utilisées dans les cases était trouée de 6 trous (4cm x 4cm) dont 2 sur chaque longueur et 1 sur chaque largeur. Elles ont été attachées dans les cases au dessus du matériel à coucher. Sept dormeurs ont été recrutés sur la base de leur consentement pour

dormir sous les moustiquaires suivant un ordre de rotation "Latin square" (annexe V). Tout en assurant le rôle de captureurs, les dormeurs s'installent sous les moustiquaires à partir de 20 heures dans les cases et ferment les portes des cases. Ainsi, le superviseur procède à l'ouverture des chicanes pour la durée de la nuit pour permettre aux moustiques de rentrer librement dans les cases. A 5 h 30 min, il ferme les chicanes à partir de l'extérieur et réveille les dormeurs. Au réveil, ils descendent les rideaux qui séparent les vérandas piège de l'intérieur des cases. Ils collectent tous les moustiques vivants ou morts à l'aide des tubes de capture (tubes à hémolyse).

Les moustiques collectés sont transportés au laboratoire dans des glacières où ils sont identifiés suivant le genre et l'espèce selon la clé d'identification de Gille (Holstein, 1949). Après cette identification, les moustiques vivants du genre *Anopheles* sont mis en observation pendant vingt-quatre (24) heures dans des gobelets pour la mortalité différée. Le nombre de femelles mortes immédiatement, gorgées, à jeun et vivant est noté dans chaque compartiment (sous moustiquaire, case et véranda) sur la fiche de collecte.

L'efficacité de chaque type de moustiquaire a été mesurée à travers les paramètres entomologiques suivants:

- deterrence qui est le pourcentage de dissuasion du nombre de moustiques pris dans les cases traitées par rapport au nombre capturé dans la case contrôle;
- exophilie qui est due à l'irritabilité de l'insecticide. Il se calcule en divisant le nombre de moustiques collectés dans la véranda piège par le nombre total retrouvé dans la case
- inhibition de repas de sang qui est la réduction du pourcentage de moustiques gorgés dans les cases contenant les moustiquaires traitées par rapport au contrôle. Elle se calcule comme suite: $((\%Gc - \%Gt) / \%Gc) * 100$ avec %Gc = proportion de femelles gorgées dans la case contrôle; %Gt = proportion de femelles gorgées dans les cases traitées;
- mortalité qui est le pourcentage de moustiques morts collectés dans les différentes cases.

A l'issue des 24h d'observation, les femelles vivantes gorgées sont transférées individuellement dans des gobelets pour une mise en ponte afin de mesurer l'effet de stérilisation et de reproduction à travers le pourcentage de réduction en fécondité et fertilité.

II.3.3. Bioessais

Des analyses biologiques ont été réalisées sur les moustiquaires dans les cases expérimentales en utilisant les cônes OMS. Des femelles d'*An. gambiae* Kisumu issues de l'insectarium âgées de 3 à 5 jours ont été utilisées. Pour ce faire, 10 cônes dont 2 par côté sont montés sur chaque moustiquaire en cours d'utilisation dans les cases expérimentales. Dix moustiques sont introduits dans chaque cône pour un contact d'une durée de 3 min. A l'issue du temps de contact les moustiques sont transférés dans des gobelets neutres nourris à l'aide de glucose (5%) et apportés au laboratoire pour une observation de 24 heures afin de déterminer la mortalité différée. Après cette phase d'observation, les survivants sont nourris au sang de lapin et mis en ponte individuelle afin d'évaluer la fécondité et la fertilité.

II.4. Analyse des données

Les données ont été saisies sous Excel 2007 ainsi que les graphiques. Une analyse avec le logiciel GraphPad Prism version 5.00 a été effectuée pour comparer les proportions moyennes des paramètres étudiés des moustiquaires imprégnées à ceux du contrôle. La comparaison a été faite par une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test non-paramétrique de Kruskal Wallis. La valeur de $P < 0,05$ a été fixée comme seuil de significativité.

La mortalité induite par chaque type de moustiquaire a été comparée à celle induite par le contrôle. Aussi, la réduction en fécondité et fertilité des moustiquaires imprégnées obtenue a été calculée à partir du nombre moyen d'œufs pondus et de larves respectivement par moustique gorgé vivant après 24 heures comparé à celui du contrôle. L'inhibition du repas de sang obtenue pour chaque moustiquaire a été calculée en comparant le nombre moyen de moustiques gorgés des moustiquaires imprégnées à celui du contrôle.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Résultats

III.1.1. Evaluation de l'efficacité des moustiquaires en phase I (laboratoire)

Le taux d'insémination des moustiques a été évalué en début de test et comparé au seuil minimal d'évaluation qui est de 80%. Les résultats obtenus étaient satisfaisants car nos spécimens avaient un taux d'insémination compris entre 90 et 100%, ce qui a permis la poursuite de notre évaluation.

III.1.1.1. Détermination du temps de régénération

Les femelles d'*An. gambiae* Kisumu âgées de 3 à 5 jours ont été testées en cône et tube OMS avec des échantillons des moustiquaires Olyset Duo à J0, J1, J2, J3, J4, J5 et J7 après trois lavages successifs.

La figure 8 montre les mortalités 24 heures après contact avec la moustiquaire Olyset Duo. La mortalité est restée quasi constante autour de 100% pour les différents intervalles d'évaluation en test tube OMS, toutefois avec une légère décroissance à J1 (~85%). Quant au test cône, la mortalité est passée de 100% à J0 à moins de 50% à J1 et n'a été stable autour de 80% qu'à partir de J3. Les mortalités témoins des deux méthodes de test sont inférieures à 5%.

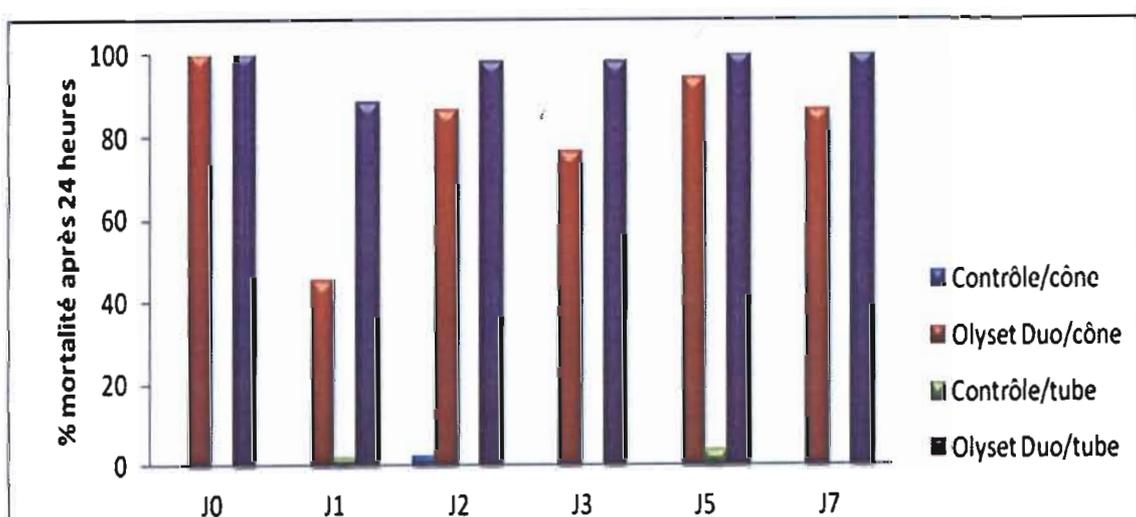
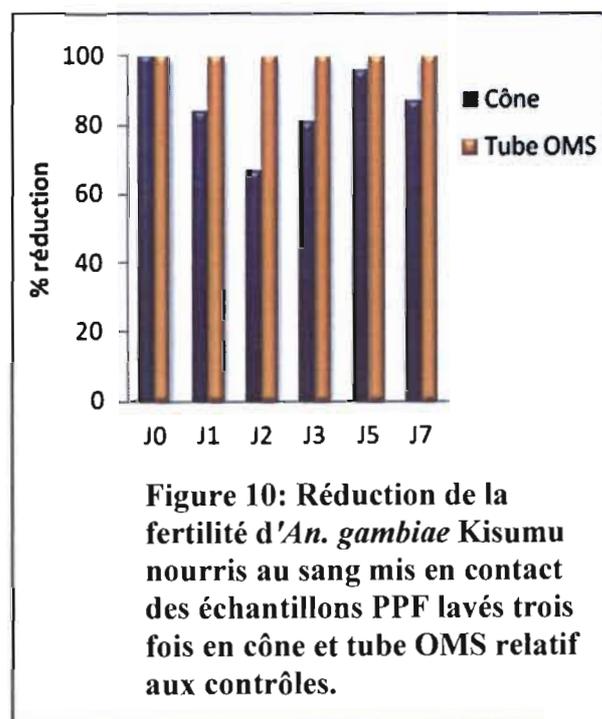
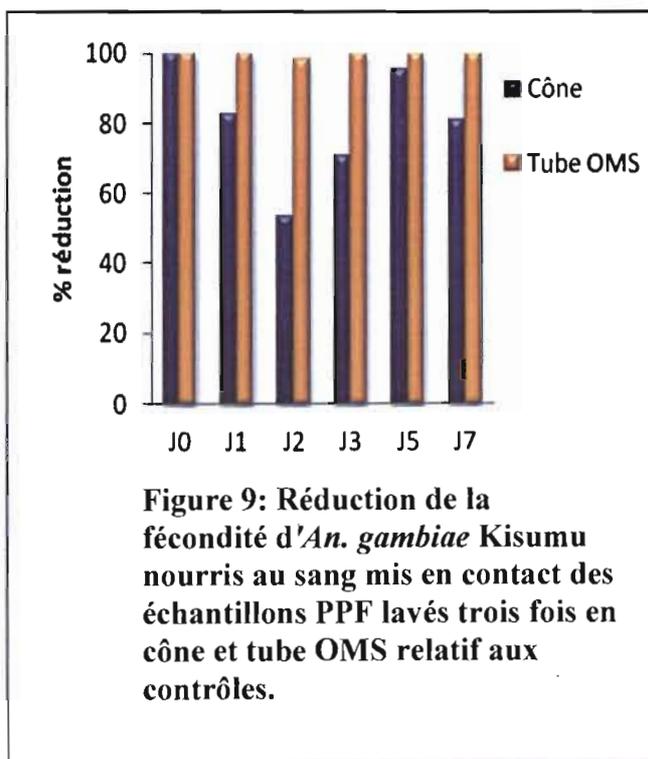


Figure 8: Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu avant et à 1, 2, 3, 5, 7 jours après trois lavages successifs avec les échantillons d'olyset Duo en cône et tube OMS.

Pour déterminer le temps de régénération de la moustiquaire PPF des femelles d'*An. gambiae* Kisumu gorgées ont été testées en cône et en tube OMS avec des échantillons de PPF lavés trois fois successivement. La réduction en fécondité et fertilité montre une baisse de réduction de 100% à J0 à des réductions inférieures ou égales à 80% à J1, J2 et J3 mais elle a augmenté à plus de 95% à J5 en test cône. Cependant en test tube OMS elle est restée constante (100%) de J0 à J7 (figures 22 et 23).



Des résultats qui précèdent, on peut estimer le temps de régénération selon le tableau I si dessous.

Tableau I : Estimation du temps de régénération des moustiquaires PPF et Olyset Duo

Types de moustiquaires	méthodes	paramètres	Temps de régénération en jours
PPF	Cône	Fécondité	3
PPF	Tube OMS	Fécondité	1
Olyset Duo	Cône	Mortalité	3
Olyset Duo	Tube OMS	Mortalité	2

III.1.1.2. Impact du PPF sur la reproduction des femelles

III.1.1.2.1. Impact sur la fécondité et la fertilité des femelles

Le nombre d'œufs et de larves nous a permis de mesurer l'impact du PPF sur ces paramètres au cours de ces trois expériences réalisées au laboratoire.

a. Expérience 1: évaluation de l'effet de stérilisation sur les femelles exposées au PPF suivant trois (03) modes du repas sanguin

Au total 5046 œufs sont pondus par les femelles contrôles contre 1233 œufs pour les femelles exposées au PPF durant ces trois cycles de ponte. En considérant le nombre de femelles vivantes après chaque cycle de ponte; la figure 11A nous donne le nombre moyen d'œufs et de larves par moustique pour chaque cycle de ponte. Le pourcentage de réduction en termes de fécondité pour les trois cycles de ponte varie de 78 à 95% (figure 11A). Quant à la fertilité, elle varie de 90 à 99% (figure 11B).

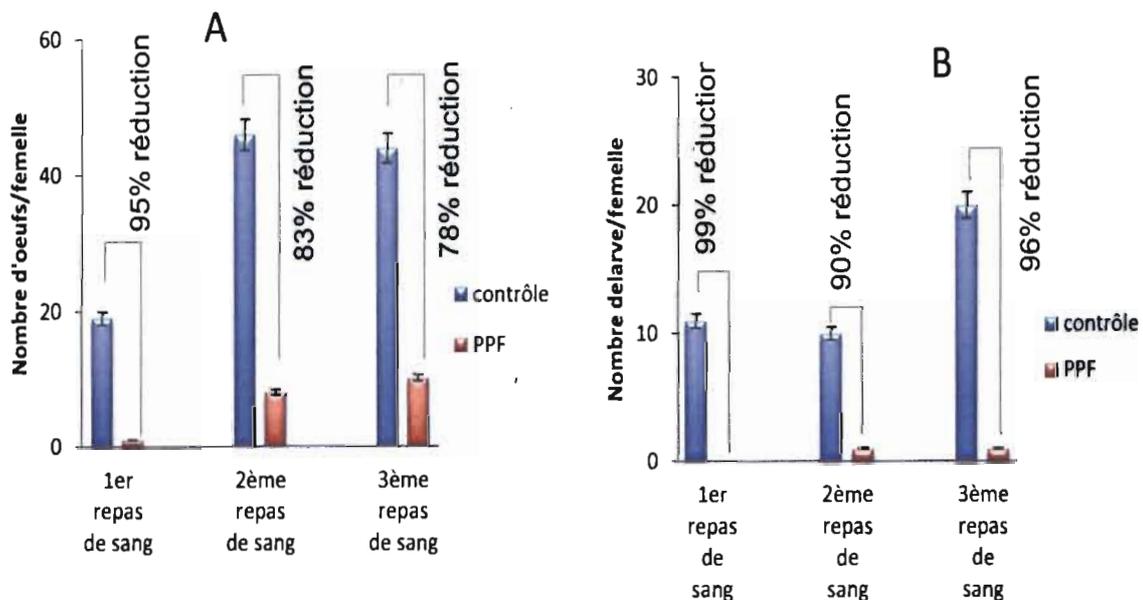


Figure11: Nombre moyen d'œufs (A) et de larves (B) par femelle des contrôles et des traitées au PPF durant les trois cycles de ponte.

b. Expérience 2: évaluation de l'effet de stérilisation sur les femelles nourries au sang 4 jours après exposition au PPF

Un total de 2653 et 578 œufs a été collecté, pondus respectivement par 53 femelles contrôles et 96 femelles traitées. La figure 12A nous présente le nombre moyen d'œufs et de larves par femelle. Nous avons observé une réduction hautement significative ($P < 0.0001$) en fécondité et fertilité de 88 et 94% respectivement.

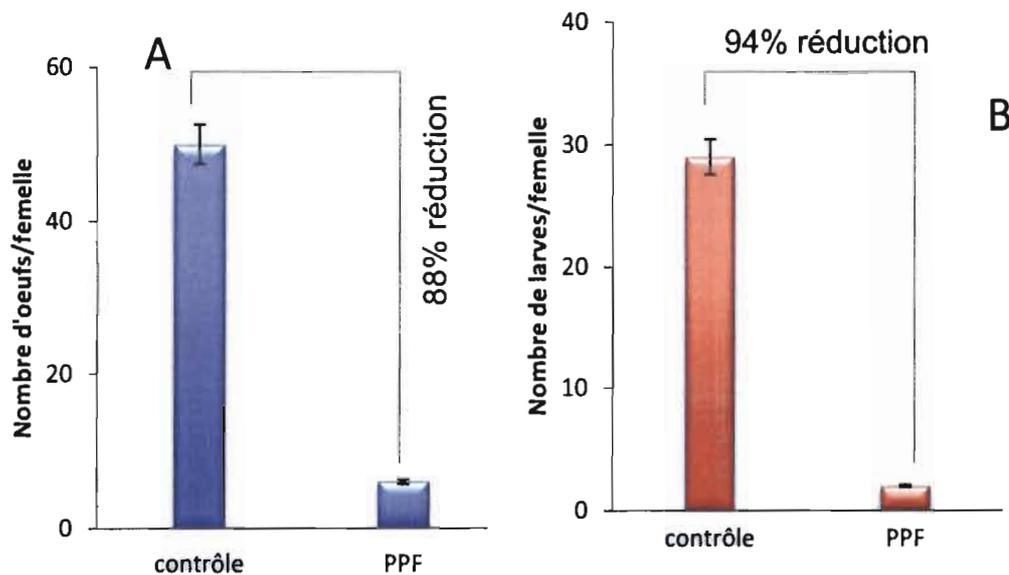


Figure 12: Nombre moyen d'œufs (A) et de larves (B) par femelle des contrôles et des traitées au PPF gorgées 4 jours après exposition

c. Expérience 3: évaluation de l'effet de stérilisation sur les femelles exposées au PPF après le 1^{er} cycle de ponte

La figure 13A montre le nombre moyen d'œufs et de larves par femelle avant et après exposition au PPF. Au total 4939 et 103 œufs ont été pondus respectivement par 110 femelles contrôles et 220 femelles traitées au PPF. Avant l'exposition des femelles au PPF, il n'y a pas eu de différence significative ($P = 0,55$) entre le nombre moyen d'œufs par femelle des contrôles et celles qui seront traitées au PPF. Cependant, après exposition, nous avons une réduction en fécondité et fertilité hautement significative ($P < 0.0001$) respectivement 98 et 99% (figure 13A&B).

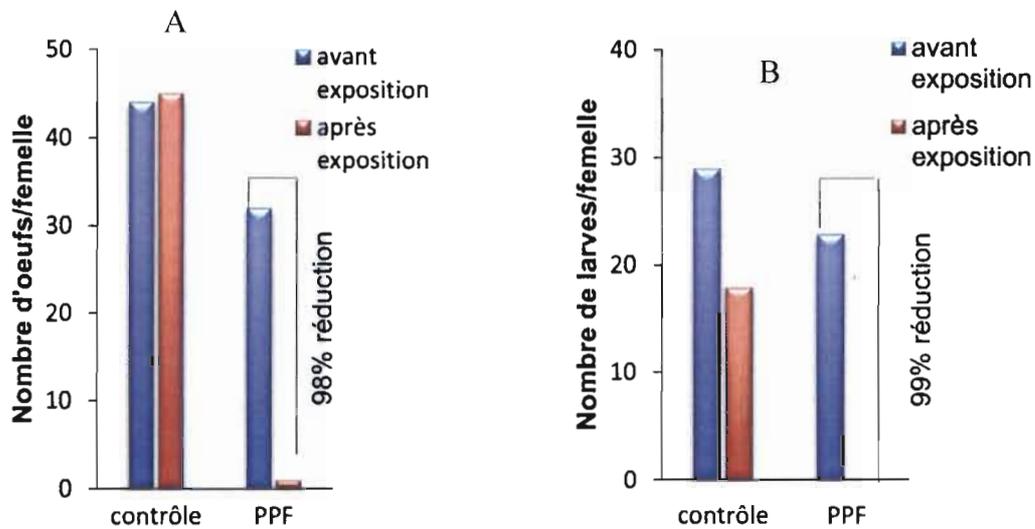


Figure 13: Nombre moyen d'œufs (A) et de larves (B) par femelle des contrôles et des traitées au PPF avant et après exposition

III.1.1.2.2. Impact sur le développement physiologique des ovaires

Des dissections réalisées ont permis de comparer le développement des œufs chez deux groupes de populations de moustiques : i) le groupe contrôle montre un développement normal des œufs qui poursuivent leur maturation 24 heures après la prise de sang (figure 14A). Ces œufs atteignent leur maturation 72 heures après gorgement. ii) le groupe de moustiques exposés au PPF présente des œufs restés immatures à 24 et 72 heures après gorgement (figures 14C&D). Au cours du développement ovarien, le groupe contrôle montre des ovarioles vides après ponte à l'exception d'un seul œuf mature retenu dans l'ovaire (figure 15A), tandis qu'on observe une rétention d'œufs immatures dans les ovaires des moustiques exposés au PPF (figure 15B).

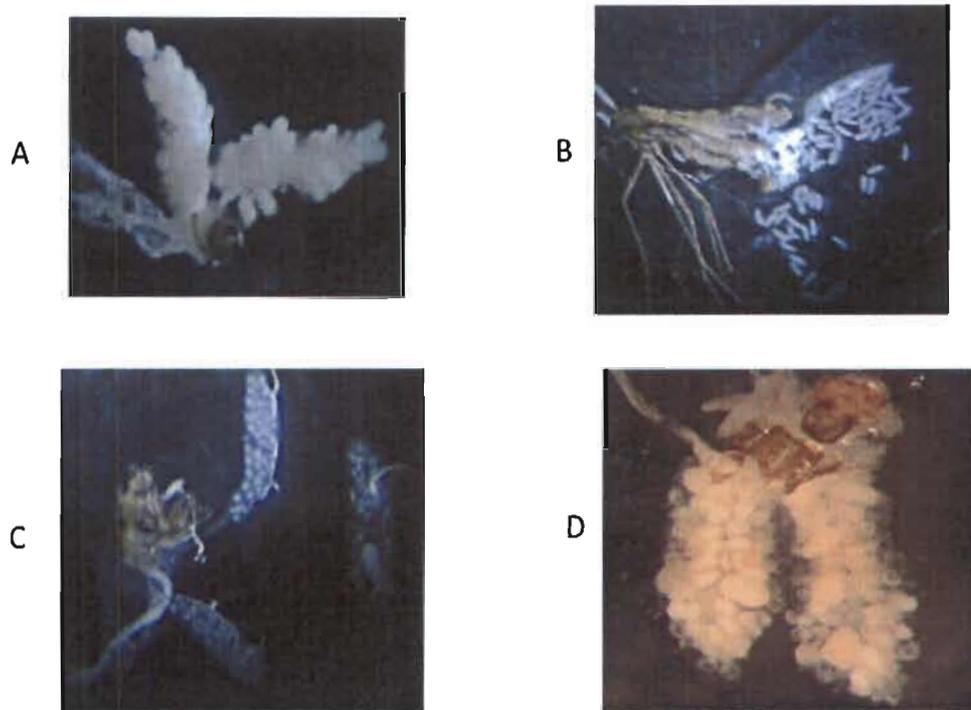


Figure 14: Ovaires des contrôles (A & B) et des traitées au PPF (C & D) 48 et 72 heures respectivement après repas de sang.

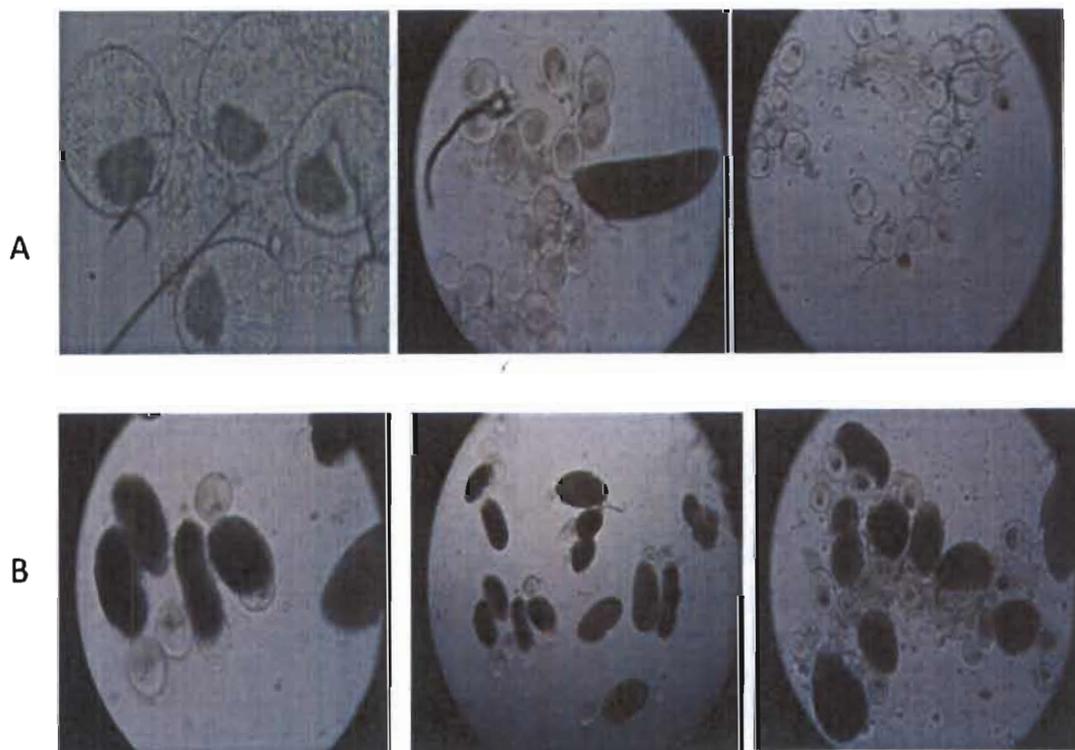
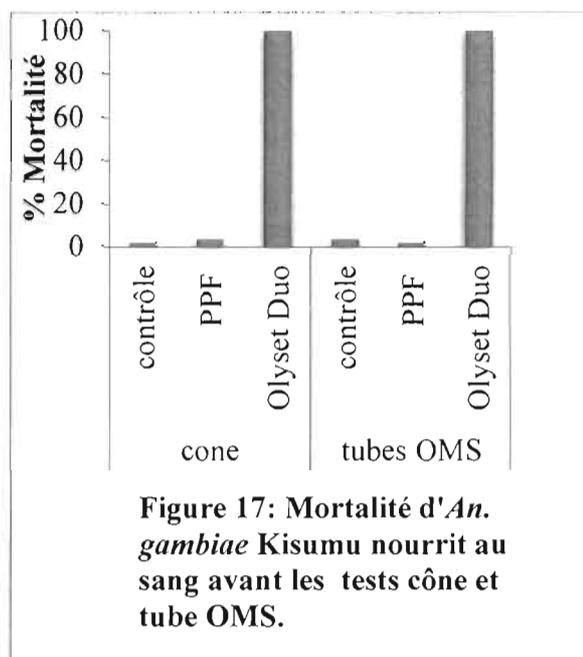
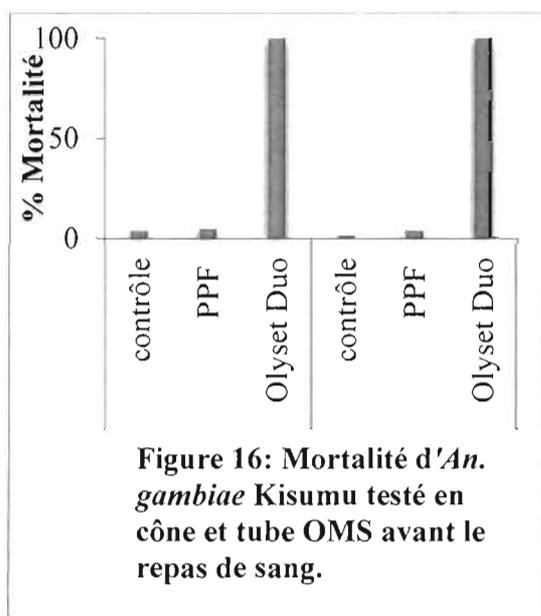


Figure 15: Ovaires des contrôles pondus (A) et des traitées non pondues ayant retenus leur œufs (B).

III.1.1.3. Activités résiduelles des moustiquaires

Des tests en cônes, tubes OMS et tunnels ont été réalisés afin de mesurer la mortalité, l'inhibition du repas de sang, la réduction en fécondité et fertilité chez deux souches de laboratoire ; *An. gambiae* Kisumu et *An. gambiae* VKPer et chez la souche de terrain nommée *An. gambiae* VK.

Les figures 16&17 montrent des mortalités après 24 heures de contact avec les moustiquaires PPF et Olyset Duo sur *An. gambiae* Kisumu à jeun et nourries au sang en cônes et tubes OMS. On observe une mortalité de 100% avec la moustiquaire Olyset Duo quel que soit le statut du moustique et du test. Cependant les mortalités sont restées presque nulles (identiques à celles des contrôles) avec la moustiquaire PPF.



La mortalité observée en test tunnel avec *An. gambiae* VKPer est supérieure à 85% avec les moustiquaires Olyset et Olyset Duo. Elle est inférieure à 20% avec le contrôle et PPF LN. Cependant avec *An. gambiae* VK, elle est d'environ 80% avec Olyset Duo et inférieure à 40% avec Olyset. Pour PPF et le contrôle, elle est similaire à celle d'*An. gambiae* VKPer.

L'inhibition du repas de sang qui a été déterminée en fonction des contrôles montre que le PPF a une inhibition presque nulle. Olyset Duo et Olyset présentent une inhibition supérieure à 40% avec les souches VKPer et VK (figures 18&19).

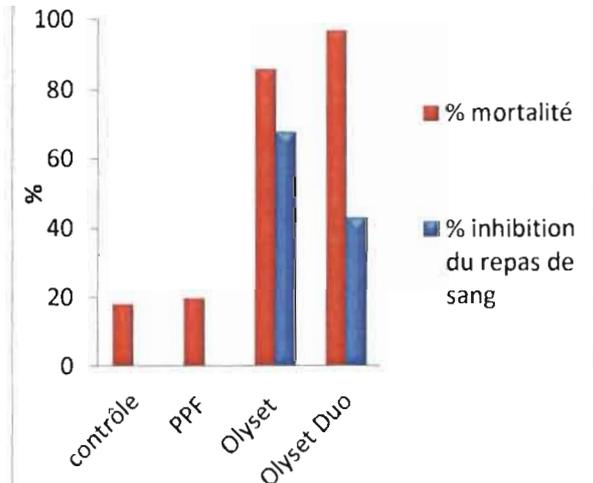


Figure 18: Mortalité et inhibition du repas de sang en test tunnel d'*An. gambiae* VKPer

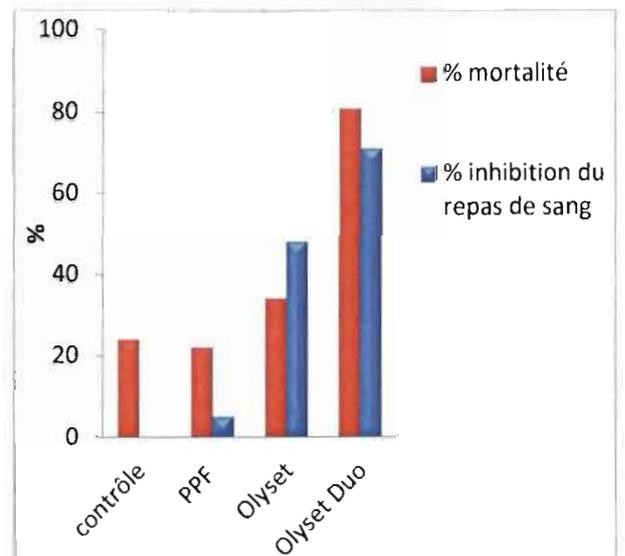


Figure 19: Mortalité et inhibition du repas de sang en test tunnel avec *An. gambiae* VK

La fécondité est fonction du nombre d'œufs pondus et la fertilité fonction du nombre d'œufs ayant éclos. Les figures 20&21 montrent une réduction totale de la fécondité et de la fertilité (100%) induite par la moustiquaire traitée au PPF en test cône et tube OMS sur *An. gambiae* Kisumu quel qu'en soit leur statut (à jeun ou gorgée).p

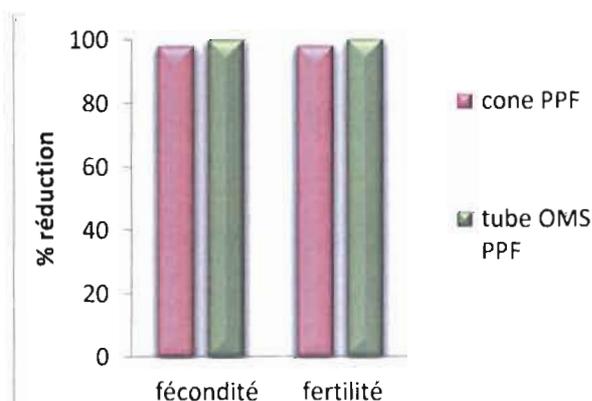


Figure 20: Réduction de la fécondité et de la fertilité d'*An. gambiae* Kisumu testé en cône et tube OMS avant le repas de sang comparativement aux contrôles.

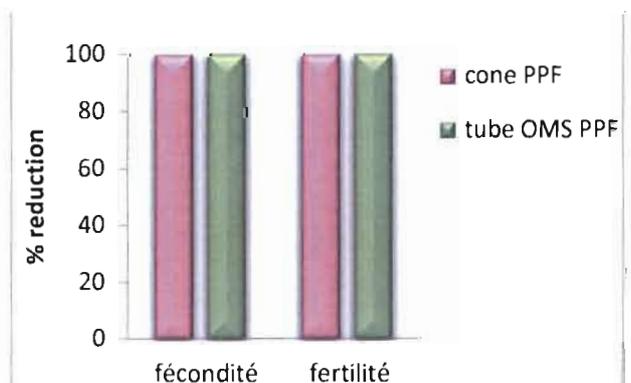
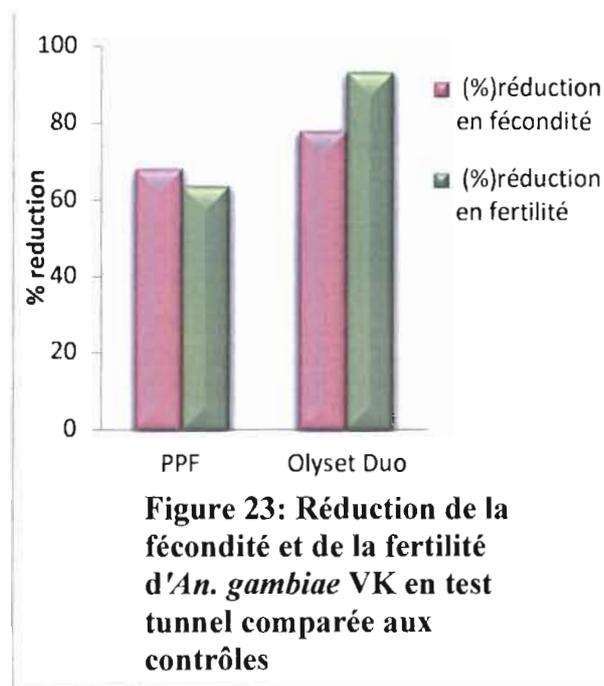
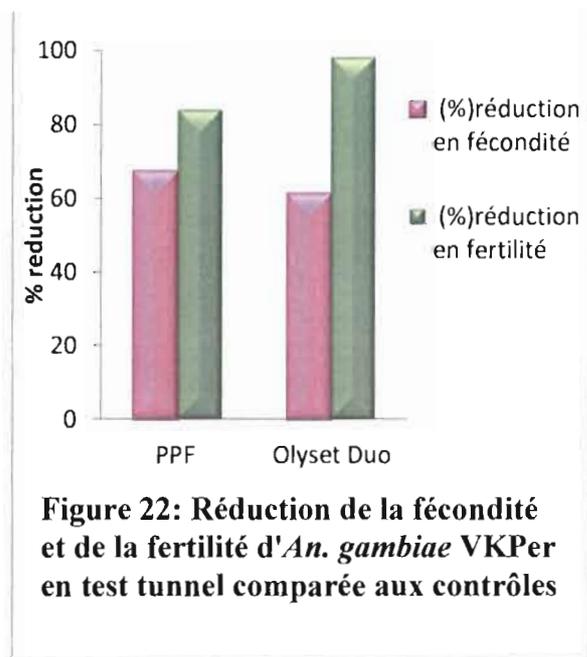


Figure 21: Réduction de la fécondité et de la fertilité d'*An. gambiae* Kisumu nourrit au sang avant les tests cône et tube OMS comparativement aux contrôles.

La réduction en fécondité et fertilité d'*An. gambiae* VKPer et VK induite par PPF et Olyset DUO en test tunnel est supérieure à 60% (figures 22 et 23).



Après la détermination du temps de régénération qui est de trois (03) jours pour les moustiquaires PPF et Olyset Duo et 7 jours pour la moustiquaire Olyset. Les moustiquaires entières ont été lavées manuellement au laboratoire avec de l'eau de source et du savon de Marseille. Les tests cônes réalisés à 0, 10 et 20 lavages avec *An. gambiae* Kisumu sur les échantillons de ces moustiquaires ont présenté des résultats de mortalité très faibles (inférieurs à 5%) avec le PPF. Cependant la mortalité obtenue avec la moustiquaire Olyset Duo est passée de 100% à zéro lavage à 43% après dix lavages et environ 25% après vingt lavages (figure 24). Le tableau II présente l'efficacité du PPF et d'Olyset Duo à 0, 10 et 20 lavages en termes de fécondité et fertilité.

Au cours de l'évaluation de ces paramètres, nous avons collecté 2996 œufs pondus par 79 femelles contrôles tandis que pour 86 femelles mises en contact avec la moustiquaire PPF (0 lavage) nous n'avons pas eu de ponte. Pour 21 femelles ayant survécu au contact de la moustiquaire Olyset (0 lavage), nous avons collecté 1034 œufs. Comparativement aux contrôles, nous avons observé une réduction en fécondité et fertilité de 100% avec le PPF tandis que Olyset n'a eu aucun effet sur la fécondité et la fertilité ($P > 0,05$).

Après 10 lavages, 75, 71 et 21 femelles ayant survécu 24 heures après contact avec respectivement les moustiquaires contrôle, PPF et Olyset Duo ont pondu respectivement

2779, 1195 et 459 œufs. Comparativement aux contrôles, la réduction en fécondité est respectivement de 55 et 54%, en fertilité est respectivement de 63 et 65% (tableau II).

Après 20 lavages des moustiquaires, 80, 72, 46 femelles ayant été en contact avec les moustiquaires contrôle, PPF et Olyset Duo ont pondu respectivement 1909, 1631 et 1235 œufs. Comparativement aux contrôles, nous n'avons pas observé de différence significative ($P > 0,05$) en termes d'œufs pondus par femelle (tableau II). La réduction en fécondité est nulle pour les deux moustiquaires. Cependant, nous avons observé une réduction en fertilité de 31% avec le PPF après les 20 lavages. Quant à Olyset Duo, elle induit une réduction en fertilité de 7%.

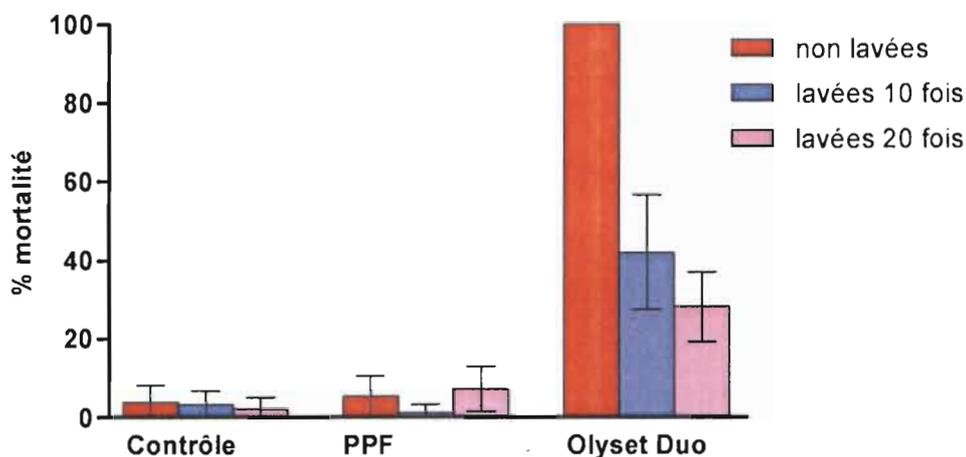


Figure 24 : Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu en test cône avec les échantillons de PPF et Duo à 0, 10 et 20 lavages manuels au laboratoire.

Tableau II : Fécondité et fertilité d'*An. gambiae* Kisumu testé en cône à zéro, dix et vingt lavages manuels au laboratoire.

	Traitements	Nombre vivant après 24h	% de ponte	Nombre d'œufs	Œufs /femelle pondue	Œufs /femelle vivant après 24h	% de réduction en fécondité	Nombre de larves	Taux d'éclosion (%)	Nombre de larves/ femelle vivant après 24h	% de réduction en fertilité
Non lavées	Contrôle	79	63	2996	56	38	-	1611	54	20	-
	PPF	86	0	0	0	0	100	0	0	0	100
	Olyset	21	57	1034	86	49	0	525	51	25	0
	Olyset Duo	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
Lavées 10 fois	Control	75	60	2779	62	37	-	1925	69	26	-
	PPF	71	35	1195	48	17	55	677	57	10	63
	Olyset Duo	27	41	459	42	17	54	245	53	9	65
Lavées 20 fois	Control	80	44	1909	55	24	-	1293	68	16	-
	PPF	72	42	1631	54	23	5	803	49	11	31
	Olyset Duo	46	50	1235	54	27	0	694	56	15	7

L'efficacité des moustiquaires non lavées et celles lavées 20 fois a été testée avec *An. coluzzii* maintenue à l'insectarium en test tunnel au laboratoire après leur utilisation sur le terrain. La figure 25 montre des mortalités de 96% et 83% induites par Olyset Duo non lavée et lavée 20 fois respectivement. Celles induites par Olyset non lavée et lavée 20 fois sont d'environ 73%. Le pourcentage d'inhibition du repas de sang est similaire à la mortalité pour chaque type de moustiquaire.

La figure 26 montre une réduction de la fécondité et de la fertilité avec des valeurs supérieures à 80% pour le PPF LN et Olyset Duo non lavées. Cependant avec PPF et Olyset Duo lavées 20 fois, la réduction de la fécondité est restée faible inférieure à 40% mais celle de la fertilité est restée supérieure à 60%. Quant à Olyset, la réduction en fécondité et fertilité est relativement faible environ 20%.

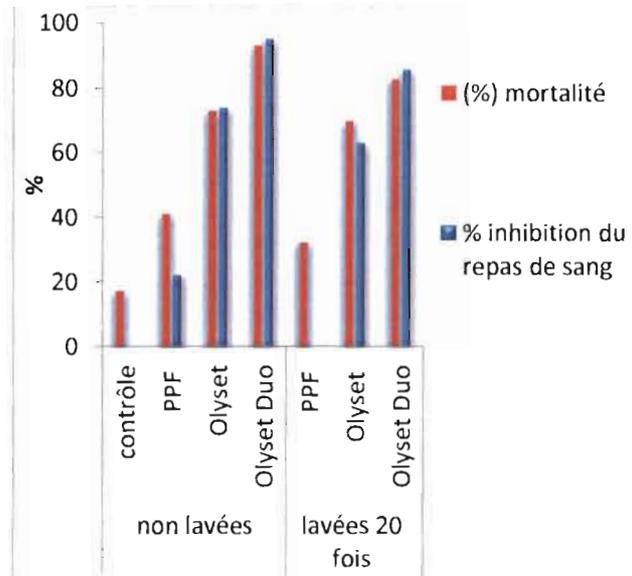


Figure 25: Mortalité et inhibition du repas de sang d'*An. coluzzii* de l'insectarium en test tunnel avec les moustiquaires non lavées et lavées 20 fois.

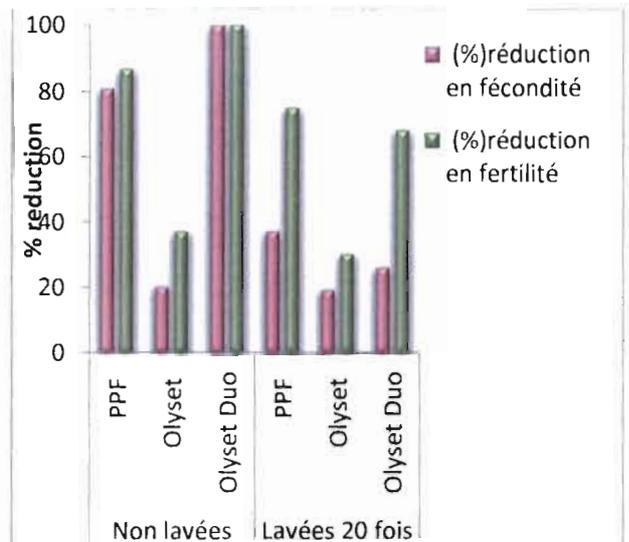


Figure 26: Réduction en fécondité et fertilité d'*An. coluzzii* de l'insectarium en test tunnel avec les moustiquaires non lavées et lavées 20 fois relatif aux contrôles.

III.1.2. Evaluation de l'efficacité des moustiquaires en phase II (cases expérimentales)

L'évaluation a duré sept (07) semaines. La mortalité, l'inhibition du repas de sang, le deterrence, l'exophilie, la fécondité et la fertilité ont été déterminés.

III.1.2.1. Détermination des paramètres entomologiques

Au total 8794 *An. gambiae s.l* ont été collectés dans les cases durant la période de l'évaluation. Le nombre d'*An. gambiae s.l* collecté dans chacune des cases contenant les moustiquaires traitées était supérieur à celui collecté dans la case contrôle. Les différents traitements n'ont pas eu d'effet sur la dissuasion des moustiques (Tableau III). L'exophilie induite par les moustiquaires traitées non lavées et lavées ne diffère pas de celle du contrôle excepté Olyset Duo avec 54% et $P < 0,05$ par rapport au contrôle. L'inhibition du repas sanguin est hautement significative avec Olyset Duo (64%) et $P < 0,05$. Les autres traitements n'ont pas eu d'effet significatif (Tableau III). L'effet observé en termes de mortalité est similaire à celui de l'inhibition du repas sanguin (Tableau III).

Tableau III: Mortalité, inhibition du repas sanguin et dissuasion d'*An. gambiae s.l* collectés dans les cases au cours de l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires

	Traitements	Nombre de femelles collectées	% de deterrence	Nombre de femelles gorgées	% de femelles gorgées	% d'inhibition du repas de sang	Nombre de femelles exophiles	% exophile	Nombre de femelles mortes après 24h	% de femelles mortes après 24h
Non lavées	Contrôle	963	-	659	68	-	221	23	127	13
	PPF	1347	0	843	63	9	337	25	258	19
	Olyset	1295	0	643	50	27	583	45	275	21
	Olyset Duo	840	13	178	21	69	456	54	278	33
Lavées 20 fois	PPF	1104	0	842	76	0	214	19	145	13
	Olyset	1728	0	1232	71	0	540	31	213	12
	Olyset Duo	1517	0	770	51	26	570	38	297	20

III.1.2.2. Effet sur la fécondité et la fertilité des populations d'*An. gambiae s.l* collectées

Au cours de l'évaluation, les taux de ponte et d'éclosion des œufs des moustiques nous ont permis de déterminer la fécondité et la fertilité. La réduction en fécondité et fertilité obtenue était relative au contrôle. Le tableau IV montre que 20% des moustiques gorgés collectés dans la case contrôle ont pondu. Le PPF non lavé présente une réduction en fécondité et fertilité de 92% et 96% respectivement. Cependant PPF lavé 20 fois ne montre pas d'effet sur la fécondité et la fertilité. Olyset Duo non lavée a induit sur les moustiques gorgés survivants une réduction en fécondité et fertilité de 41% et 57% respectivement. Cette réduction décroît à 27% et 20% respectivement pour la moustiquaire lavée 20 fois. Quant à Olyset lavée et non lavée, elles n'ont aucun effet sur la réduction en fécondité et fertilité.

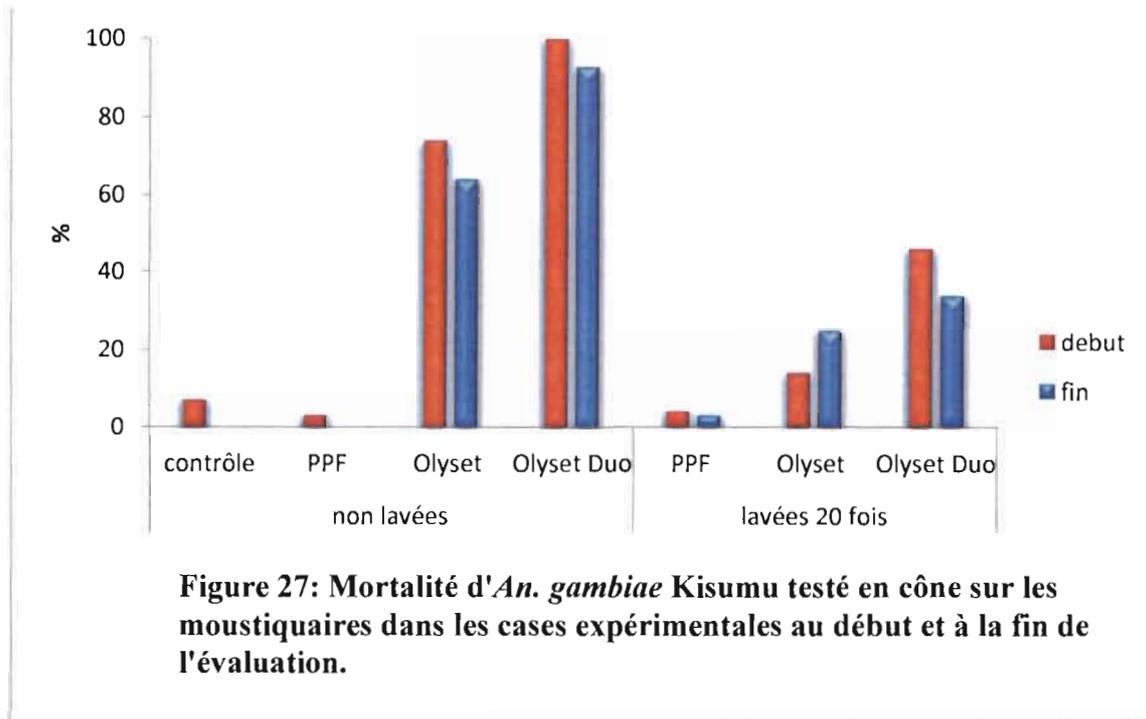
Tableau IV: Fécondité et fertilité d'*An. gambiae s.l* gorgés survivants collectés dans les cases expérimentales de VK7 lors de l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires

	Traitements	Nombre vivant après 24h	% de ponte	Nombre d'œufs	Œufs /femelle pondue	Œufs /femelle vivant après 24h	% de réduction en fécondité	Nombre de larves	Taux d'éclosion (%)	Nombre de larves/ femelle vivant après 24h	% de réduction en fertilité
Non lavées	Contrôle	611	20	14037	115	23	-	4767	34	8	-
	PPF	712	3	1329	74	2	92	208	16	1	96
	Olyset	554	20	13284	122	24	0	4346	33	8	0
	Olyset Duo	109	14	1468	98	13	41	363	25	3	57
Lavées 20 fois	PPF	764	18	18055	131	24	0	5691	32	7	5
	Olyset	1102	21	27321	119	25	0	9654	35	9	0
	Olyset Duo	669	13	11191	129	17	27	4176	37	6	20

III.1.2.3. Tests biologiques réalisés sur les moustiquaires dans les cases expérimentales

III.1.2.3.1. Mortalité

Avant et après l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires dans les cases expérimentales, des tests cônes ont été réalisés sur les moustiquaires dans les cases. Les résultats de ces tests présentent une mortalité très faible (environ 5%), similaire au contrôle avec les moustiquaires PPF au début et à la fin de l'évaluation (figure 27). Olyset et Olyset Duo non lavées présentent des mortalités très élevées 74 et 100% respectivement au début de l'évaluation. A la fin de l'évaluation, ces mortalités ont décliné faiblement à 64 et 93% respectivement. Elles sont restées inférieures à 50% avec les moustiquaires lavées 20 fois au début et à la fin de l'évaluation (figure 27).



III.1.2.3.2. Fécondité et fertilité

La fécondité et la fertilité sont réduites avec le PPF non lavé au début de l'évaluation comparativement au contrôle (97 et 98% respectivement) (Tableau V). A la fin de l'évaluation, elles sont passées à un taux relativement bas avec PPF et Olyset Duo non lavées (Tableau VI). Le PPF lavé a induit une réduction en fécondité et fertilité élevée (76 et 93% respectivement) au début de l'évaluation (Tableau V). Cette réduction est passée à 53 et 67% respectivement à la fin de l'évaluation (Tableau V). Olyset non lavé et lavée n'ont pas eu d'effet sur la fécondité et la fertilité comparativement au contrôle. Olyset Duo lavée au début n'a pas présenté d'effet sur la fécondité et la fertilité (Tableau V). Cependant à la fin nous avons observé une réduction en fécondité et fertilité de 25 et 49% respectivement (Tableau VI).

Tableau V : Fécondité et fertilité d'*An. gambiae* Kisumu testé en cône sur les moustiquaires dans les cases expérimentales au début de l'évaluation.

	Traitements	Nombre vivant après 24h	% de ponte	Nombre d'œufs	Œufs /femelle pondue	Œufs par femelle vivante après 24h	% de réduction en fécondité	Nombre de larves	Taux d'éclosion (%)	Nombre de larves /femelle vivante après 24h	% de réduction en fertilité
Non lavées	Contrôle	71	46	2891	88	41	-	1322	46	18	-
	PPF	51	2	60	60	1	97	16	27	0	98
	Olyset	48	63	2533	87	53	0	1145	45	24	0
	Olyset DUO	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lavées 20 fois	PPF	74	19	712	51	10	76	96	13	1	93
	Olyset	81	40	2888	90	36	9	1354	47	17	7
	Olyset DUO	64	58	3701	100	58	0	1422	38	22	0

Tableau VI : Fécondité et fertilité d'*An. gambiae* Kisumu testé en cône sur les moustiquaires dans les cases expérimentales à la fin de l'évaluation.

	Traitements	Nombre vivant après 24h	% de ponte	Nombre d'œufs	Œufs /femelle pondue	Œufs /femelle vivante après 24h	% de réduction en fécondité	Nombre de larves	Taux d'éclosion (%)	Nombre de larves /femelle vivante après 24h	% de réduction en fertilité
Non lavées	Contrôle	81	78	4747	75	58	-	3283	69	40	-
	PPF	74	18	1018	78	13	77	454	45	6	85
	Olyset	30	53	1777	73	59	0	1285	67	43	0
	Olyset Duo	4	50	138	69	34	41	54	39	13	67
Lavées 20 fois	PPF	72	43	2001	64	27	53	959	48	13	67
	Olyset	53	68	3020	83	57	3	2061	68	39	4
	Olyset Duo	50	46	2187	95	44	25	1041	48	21	49

III.2. Discussion

Les Pyréthriinoïdes sont les composés les plus utilisés en santé publique à cause de leur haute efficacité et leur effet excito-répulsif sur les insectes, ainsi que leur faible toxicité pour les mammifères (Mittal et *al.*, 1991; Zaim et *al.*, 2000). Ils sont les seuls classes d'insecticides recommandées par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires (WHO, 2007). Malheureusement, la résistance des vecteurs du paludisme à cette classe d'insecticide s'est généralisée dans plusieurs pays endémiques du paludisme. Ce qui peut compromettre à l'avenir le succès des programmes de lutte contre le paludisme (Dabiré et *al.*, 2009). Il est urgent de trouver de nouvelles formulations ou des insecticides de remplacement.

Dans cette étude, nous cherchions à déterminer l'impact des moustiquaires PPF, Olyset Duo et Olyset sur les populations d'anophèles résistantes aux Pyréthriinoïdes. Il s'agissait d'étudier l'impact du Pyriproxifène seul et du Pyriproxifène en combinaison avec la perméthrine sur la mortalité, la fécondité et la fertilité des moustiques comparativement au contrôle (moustiquaire non imprégnée).

III.2.1. Le temps de régénération

Le temps de régénération est le temps nécessaire mis par l'insecticide pour revenir à la surface des fibres moustiquaires après lavage. Les tests en cône et tube OMS en 3 min de contact après 3 lavages successifs le même jour nous a permis de déterminer celui des moustiquaires PPF et Olyset Duo. Selon les résultats (tableau I), ce temps a été estimé à trois jours pour les deux moustiquaires. Ce temps correspondait à celui du test en cône. Il était difficile d'estimer le temps de régénération en se basant sur les résultats des tests en tube OMS car les mortalités étaient quasi identiques entre J0 et J7. Les mortalités sont plus élevées en tube OMS car les moustiques ont un contact forcé avec cette méthode de test.

III.2.2. La mortalité

L'efficacité des moustiquaires a été d'abord testée avec *An. gambiae* Kisumu, la souche sensible de référence, en cône et tube OMS.

La mortalité observée 24 heures après exposition au PPF est similaire à celle du contrôle. Le Pyriproxifène ne confère pas de mortalité immédiate ou dans les 24 heures après contact. Cependant avec Olyset Duo nous avons observé une mortalité de 100% (figures 16 et 17). Olyset Duo étant un mélange de pyréthriinoïde (perméthrine) et de PPF, il est tout à fait

normal que nous obtenions une mortalité élevée car *An. gambiae* Kisumu est sensible à l'ensemble des insecticides.

Après la souche sensible, des souches résistantes (*An. gambiae* VKPer de l'insectarium et *An. gambiae* VK) ont été testées en tunnel avec les échantillons des moustiquaires contrôle, PPF, Olyset et Olyset Duo. La mortalité induite par le PPF est similaire à celle du contrôle. Ce qui confirme les résultats précédents avec la souche Kisumu en test cône et tube OMS. Olyset et Olyset Duo ont induit des mortalités assez élevées (plus de 80%) avec *An. gambiae* VKPer de l'insectarium. Cette souche longtemps maintenue en insectarium serait donc devenue moins résistante à la perméthrine du fait de n'avoir pas été soumise à un régime de sélection de la résistance pendant sa captivité. Avec *An. gambiae* VK venu de la Vallée du Kou, il n'y a pas eu de différence significative ($P > 0,05$) de mortalité induite entre Olyset et le contrôle. Ce qui pourrait s'expliquer par la résistance de cette souche aux pyréthriinoïdes qui est très élevée dans cette zone (Namountougou *et al.*, 2012).

Cependant nous avons observé une mortalité élevée avec Olyset Duo (environ 80%) qui a une plus grande concentration de perméthrine qu'Olyset. Ces mêmes résultats ont été observés par Corine et collaborateurs en 2014 en cases expérimentales (Corine *et al.*, 2014). Il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) en termes d'inhibition du repas de sang avec VKPer et VK en test tunnel.

Après avoir testé les moustiquaires avec les différentes souches du laboratoire, nous avons procédé au lavage de celles-ci pour des tests en cases expérimentales.

Selon l'OMS, une MILDA à usage domestique doit être efficace après 20 lavages. Ainsi l'efficacité des moustiquaires a été testée à différents temps de lavages.

Les tests cônes réalisés à 0, 10 et 20 lavages avec *An. gambiae* Kisumu montrent une diminution de la mortalité lorsque le nombre de lavage augmente (figure 24). Cette décroissance pourrait s'expliquer qu'après les 10 lavages, la quantité d'insecticide à la surface de la moustiquaire n'était plus assez pour tuer les moustiques dans ce laps de temps de 3 min de contact.

Après les travaux de la phase I (laboratoire), les moustiquaires ont été testées en phase II (case expérimentales). L'évaluation s'est déroulée à la Vallée du Kou, une zone à forte résistance des moustiques aux insecticides surtout à la perméthrine (Namountougou *et al.*, 2012).

Les résultats montrent que les moustiquaires lavées et non lavées, exception faite de la moustiquaire Olyset Duo non lavée, ne confèrent pas de protection contre *An. gambiae s.l* car l'inhibition de repas de sang et les mortalités obtenues avec ces moustiquaires sont comparables à celles des contrôles (tableau III). Olyset Duo non lavée induit une inhibition de

repas de sang et une mortalité élevées comparativement au contrôle. Ces résultats corroborent ceux obtenus au laboratoire (phase I) avec la même moustiquaire. Olyset Duo est plus efficace qu'Olyset en termes de protection et de mortalité. L'efficacité de cette moustiquaire pourrait être due à un effet de synergie ou d'addition. En effet, Ohashi et collaborateurs en 2012 ont montré que le PPF réduisait la longévité d'*An. gambiae* (Ohashi et al., 2012). La mortalité très faible (similaire au contrôle) observée avec la moustiquaire Olyset (tableau III) confirme la résistance d'*An. gambiae* à la perméthrine décrite dans la zone. Les résultats en termes de mortalité obtenus avec la moustiquaire Olyset Duo dans cette zone donne espoir que le mélange d'insecticide peut être un outil pour faire face à la résistance du principal vecteur du paludisme *An. gambiae* en Afrique sub-saharienne.

III.2.3. Impact du Pyriproxifène sur la fécondité et la fertilité des moustiques

L'effet du Pyriproxifène sur la fécondité et la fertilité a été étudié chez plusieurs insectes, mais il ya peu d'études réalisées sur *An. gambiae* surtout sur les mécanismes par lesquels le Pyriproxifène inhibe la reproduction des femelles.

Nos résultats ont fourni une preuve supplémentaire que le contact du tarse avec une moustiquaire traitée au Pyriproxifène stérilise les femelles adultes d'*An. gambiae* dans les conditions de laboratoire en inhibant soit le développement des œufs ou l'éclosion.

En termes de stérilisation des femelles, les résultats ont montré avec *An. gambiae* VKPer et VK une réduction en fécondité et fertilité supérieure à 60% induite par PPF et Olyset Duo comparativement aux contrôles avec les moustiques gorgés survivants après contact en test tunnel. Avec *An. gambiae* Kisumu nous avons obtenu une stérilisation totale de toutes les femelles traitées au PPF. Des résultats similaires ont été obtenus par Harris et collaborateurs en 2013 avec *An. arabiensis* (Harris et al., 2013).

Ainsi l'efficacité des moustiquaires a été aussi testée à différents temps de lavages.

Les tests en cônes réalisés à 0, 10 et 20 lavages avec *An. gambiae* Kisumu nous a permis de mesurer l'activité résiduelle des moustiquaires. Nous avons observé une diminution de réduction en fécondité et fertilité comparativement aux contrôles au fur et à mesure que le nombre de lavage augmente (tableau II). Cette décroissance pourrait s'expliquer par le fait qu'après plusieurs lavages, la quantité d'insecticide à la surface de la moustiquaire n'était plus suffisante pour inhiber le développement des œufs des moustiques dans ce laps de temps de contact.

En plus, avec *An. coluzzii* en test tunnel, nous avons observé une réduction en fertilité d'environ 80% après 20 lavages avec les moustiquaires PPF et Olyset Duo (figure 26) comparativement aux contrôles. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le test tunnel permet un long contact car il dure toute la nuit. Il peut être aussi dû à la ponte des œufs infertiles ou à une contamination verticale du gîte de ponte par le moustique traité au PPF (Ohba et *al.*, 2013).

L'efficacité des moustiquaires a été aussi évaluée en phase II sur les populations d'*An. gambiae s.l.* Les femelles collectées survivantes ayant pris le repas de sang ont été mises en ponte individuelle. 20% des contrôles ont pondu dans les conditions de laboratoire. Les moustiques collectés sur le terrain pondent difficilement dans les conditions de laboratoire par rapport aux souches maintenues longtemps au laboratoire. La réduction en fécondité et fertilité observées avec la moustiquaire PPF non lavée comparativement au contrôle (tableau IV) montre que le PPF a un effet stérilisant très élevé sur le développement des œufs des moustiques. Ce même résultat a été observé pour la même moustiquaire avec les tests réalisés en phase I (laboratoire) sur les souches de l'insectarium. Cette même moustiquaire lavée 20 fois n'a pas eu d'effet sur la fécondité et la fertilité.

L'effet d'Olyset Duo non lavée sur la fécondité et la fertilité est beaucoup plus moindre. Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette moustiquaire (perméthrine + PPF) est irritante car la perméthrine a un effet excito-répulsif et ne permet donc pas aux moustiques de rester assez longtemps en contact ou même pas avec la moustiquaire pour que le PPF puisse avoir un impact sur eux. La moustiquaire lavée 20 fois présente une réduction en fécondité et fertilité aussi moindre (tableau IV). Ces résultats sont confirmés par ceux des tests en cônes de fin d'évaluation (tableau VI). Cela pourrait s'expliquer qu'au fur et à mesure que le temps passe, la quantité de perméthrine se dégrade et la moustiquaire perd son pouvoir d'irritabilité, ou par la résistance des vecteurs à la perméthrine.

Les résultats des tests en cônes réalisés sur les moustiquaires en évaluation avec *An gambiae* Kisumu avant et après évaluation, Olyset Duo lavée (tableau V&VI) n'a montré aucun effet en terme de stérilisation au début. Cependant, à la fin elle a montré une réduction de 25 et 49% respectivement en fécondité et fertilité. Cela confirme l'hypothèse de dégradation de la perméthrine ce qui a permis aux moustiques d'être longtemps en contact avec le PPF.

Les résultats ont montré que si *An. gambiae* reste en contact prolongé avec la moustiquaire Olyset Duo en cherchant à prendre son repas de sang et ne parvient pas à être tué à cause de sa résistance à la perméthrine, il peut être stérilisé et cela peut réduire la densité des populations à la première génération (F1).

III.2.4. Impact du Pyriproxyfène sur le développement des ovaires

Après avoir déterminé l'impact du Pyriproxyfène sur la fécondité et la fertilité, nous avons cherché à connaître par quel mécanisme il agit sur les pontes. Ce qui nous a amené à la dissection des ovaires des femelles du moustique 48 à 72 heures après le repas de sang et aussi ayant été en contact avec la moustiquaire traitée au PPF.

Les résultats nous ont montré que le PPF altère le développement des œufs dans les ovaires d'*An. gambiae*, l'un des vecteurs du paludisme les plus importants dans de nombreuses régions de l'Afrique subsaharienne par la présence d'œufs immatures. L'exposition des femelles au PPF a affecté la vitesse à laquelle les follicules ovariens se développent à partir du stade de repos prévitellogénique jusqu'à la maturité. Les femelles émergent du stade larvaire avec leurs follicules primaires au stade I et ont besoin d'un repas de sang pour achever le développement des follicules jusqu'au stade V de Christophers (Christophers, 1911).

Dans notre étude, 3 min de contact des moustiques avec le PPF a été nécessaire pour inhiber le développement des œufs.

L'hormone juvénile joue un rôle très important dans le développement des follicules chez les insectes. Elle contrôle la vitellogenèse par induction de la vitellogénine dans les corps gras de l'insecte. Le PPF, un analogue de l'hormone juvénile inhiberait la synthèse de cette hormone ce qui pourrait jouer sur le développement des follicules. Aussi, après un repas de sang, le niveau de l'hormone juvénile peut diminuer ce qui déclencherait la sécrétion d'ecdysone par l'ovaire. Une fois libérée, l'ecdysone dirige le développement des œufs (Brabant et al., 2013). Nous pensons que le PPF, analogue d'hormone juvénile inhiberait la libération de l'ecdysone. Dans une récente étude, le Méthoprène, une autre analogue d'hormone juvénile a montré une réduction considérable de la taille des ovaires et des ovocytes chez les femelles d'*Aedes aegypti* (Brabant et al., 2013).

III.2.4. Place de la moustiquaire Olyset Duo dans le management de la résistance

Les résultats des tests biologiques au laboratoire et de l'évaluation dans les cases expérimentales des moustiquaires Olyset et Olyset Duo montrent que Olyset Duo fournit une mortalité supplémentaire avec *An. gambiae s.l* par rapport à Olyset qui est imprégnée par la perméthrine seule. En plus, elle confère une protection en termes de piqûres plus importante qu'Olyset. Au regard des résultats du PPF sur la stérilisation des populations d'*An. gambiae s.l*; il est encourageant de constater qu'Olyset Duo stérilise les femelles d'*An. gambiae s.l*. La

raison principale du mélange de la perméthrine et du Pyriproxifène est de réduire par la stérilisation, la densité des vecteurs résistants à la perméthrine par la réduction du taux de reproduction de la génération parentale qui aurait été en contact avec la moustiquaire Olyset Duo. Selon N'gufor et collaborateurs en 2014, cela prédirait que la diminution de la densité des vecteurs du paludisme résistants aux pyréthriinoïdes peut être atteinte par une grande utilisation des moustiquaires Olyset Duo par les communautés que les moustiquaires imprégnées uniquement aux pyréthriinoïdes (N'gufor et *al.*, 2014). Des études ont montré le potentiel de ces mélanges. Cela soulève l'espoir d'un nouvel outil viable de contrôle des vecteurs pour aider à lutter contre la résistance aux insecticides (Mosqueira et *al.*, 2010; N'gufor et *al.*, 2014).

Olyset Duo montre également le potentiel de ralentir ou de prévenir d'autres sélections de résistance aux pyréthriinoïdes. Cependant, comme la gestion de la résistance est moins susceptible d'être atteints dans les zones où la résistance est bien établie (Denholm et *al.*, 1992) ces moustiquaires peuvent être déployées dans les zones où la résistance est encore rare afin de tester pleinement une telle stratégie de gestion de la résistance pour voir la capacité ou non d'Olyset Duo à empêcher la sélection de la résistance aux pyréthriinoïdes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

La présente étude est en prélude à la recherche d'un nouvel insecticide ou de formulation pour l'imprégnation des moustiquaires pour faire face à la résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes. Au cours de ce travail nous avons testé l'efficacité des moustiquaires imprégnées de Pyriproxifène seul et de Pyriproxifène + Perméthrine, non lavées et lavées 20 fois, au laboratoire (phase I) et en casés expérimentales (phase II).

La moustiquaire imprégnée de Pyriproxifène uniquement non lavée a montré une efficacité de stérilisation des femelles d'*An. gambiae s.l.* en phase I et II très élevée mais n'a eu aucun effet sur la mortalité des moustiques. En combinaison avec un pyréthrinoïde (Duo), la proportion des moustiques stériles a diminué en phase II due au caractère irritant de la moustiquaire. En effet, le taux de mortalité avec elle est plus important que la moustiquaire imprégnée uniquement de Perméthrine (Olyset). Cependant, les moustiquaires perdent leur efficacité après 20 lavages.

Le Pyriproxifène en association avec un pyréthrinoïde peut être une solution pour faire face à la résistance des moustiques aux Pyréthrinoïdes. Au regard des résultats obtenus, il pourrait être un outil efficace dans la lutte anti-vectorielle pour le contrôle du paludisme. Il serait encore plus efficace si après 20 lavages, la moustiquaire avait un impact significatif sur les moustiques résistants comme le recommande l'OMS.

Perspectives

- ✓ Il faudrait donc revoir le système d'imprégnation des moustiquaires ou la nature des fibres des moustiquaires pour permettre une meilleure adhésion de l'insecticide dans les fibres et une régénération afin qu'après plusieurs lavages les moustiquaires puissent être toujours efficaces;
- ✓ Il serait souhaitable d'investiguer sur une résistance croisée d'*An. gambiae* entre le Pyriproxifène et les Pyréthrinoïdes;
- ✓ Etudier l'impact du transfert du PPF dans les gîtes larvaires par les femelles qui ont été en contact avec l'insecticide à travers l'émergence des adultes;
- ✓ Etudier l'impact du PPF sur la densité des moustiques en phase III.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aida C., Irene R., C., Michela M., Paolo R., Patrizia S., Elena C., Sara E., Mauro A., Matteo V., Luciano S., Claudio B., Daniele D., Mauro M., Guido F., (2013). Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in Malaria Symbiotic Control. *Parasites & Vectors* 2013, 6:182 doi:10.1186/1756-3305-6-182
- Baldet T., Diabaté A., Guiguemdé R. T., (2003). La transmission du paludisme dans la zone rizicole de la vallée du Kou (Bama), (Burkina Faso). *Cahiers Santé*. 13 : 55 -60.
- Brabant P. J., Dobson S. L., (2013). Methoprene effects on survival and reproductive performance of adult female and male *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 2013, 29:369-375.
- Brunhes J., Legoff G., Manga L., Geoffroy B., (1998). *Anopheles* afrotropicaux IV. Mise au point sur le complexe *Anopheles moucheti*, Réhabilitation d'*An. multincinctus* et d'*An. Garnhami basilewskyi* (Diptera: Culicidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 34, 397-405.
- Catteruccia F., Crisanti A., Wimmer E. A., (2009). Transgenic technologies to induce sterility. *Malar J*, 8(Suppl 2):S7 doi: 10.1186/1475-2875-8-S2-S7.
- Cédric P., (2010). Résistance aux insecticides. UR16Vecteurs.
- Chapman R. F., (1969). *The insects structure and function*. The English Universities Press Ltd. London, UK: 819p.
- Christophers S. R., (1911). The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism* 1911, n°. 2, 73-8, 1pl.
- Clements A. N., (1992). *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction*. London, Chapman and Hall. 509p.
- Cohuet A., Simard F., Toto J. C., (2003). Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *American Journal of Tropical and Medical Hygiene*, 69 (2), 200-205.
- Coluzzi M., (1984). Heterogeneities of malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 62(Suppl.):107-113.
- Dabiré K. R., Diabate A., Namountougou M., Toe K. H., Ouari A., Kengne P., Bass C., Baldet T., (2009). Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr

- mutation in *Anopheles gambiae s.l.* From Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103 1113-1120.
- Dabiré K. R., Diabaté A., Namountougou M., Djogbenou L., Kengne P., Brengues C., Gouagna L. C., Hougard J. M., Chandre F., Baldet T., (2008). The distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1) in *Anopheles gambiae s.l.* Population from Burkina Faso (West Africa). *Acta Tropica*.
- Dabiré K. R., Diabaté A., Djogbénou L., Baldet T., Ouari A., N'Guessan R., Ouédraogo J. B., Costantini C., Hougard J. M., Chandre F., (2007). Dynamics of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and occurrence of ace.1 mutation in Vallée de Kou, a rice growing area from Burkina faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*
- Darriet, F., Corbel V., (2006). Laboratory evaluation of pyriproxyfen and spinosad, alone and in combination, against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *Journal of Medical Entomology.*, 43: 1190-1194.
- Della Torre A.; Fanello C., Akogbeto M., Dossou Y., Favia G., Petrarca V., Coluzzi M., (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *An. gambiae ss* in West Africa. *Insect. Mol. Biol.* 10 (1), 9-18.
- Denholm I, Rowland M. W., (1992). Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomol* 37: 91–112.
- Diabaté A., (2003). Le paludisme au Burkina Faso: étude de la transmission et repartition géographique de la résistance d'*Anopheles gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes. Thèse de doctorat, Montpellier 2, 123p.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Guiguendé T. R., Guillet P., (2002). First report of the kdr mutation in *An. gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parasitologia*, 44(3-4): 157-158.
- Dong K., (1986). A single amino acid change in the para-sodium channel protein is associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroids insecticides in German cockroach. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, 27: 93 100.
- Fontenille D., Lochouarn L., (2006). Genetic heterogeneity of African malaria vectors Pierre Guillet 01/07/2006.
- Fontenille, D., Simard, F., (2004). Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vectors populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27: 357-375.
- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P. H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccolini D., Duchemin J-B., Rajaonarivelo V., Dabiré K. R., Adja-Akre

- M., Ceainu C., Legoff G., Simard F., (2003). Systématique et Biologie des Anophèles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Med Trop*, **63** : 247-253.
- Fontenille D., Lochouart L., (1999). The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parasitologia*. 41: 267-271.
- Gillies M. T. et De Meillon B., (1968). The Anopheline of Africa south of the Sahara. nst. *Med. Res.* 54: 343p.
- Hamon L., Adam J. P., Grjebine A., (1956). Observations sur la répartition et le comportement des Anophèles de l'Afrique équatoriale française, du Cameroun et de l'Afrique occidentale. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 15: 549-591.
- Harbach R. E., (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 94(6): 537-553.
- Harbach R. E., (1994). Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research* 84, 331-342.
- Holstein M., (1949). Guide pratique de l'anophélisme en A.O.F. 55p.
- Hunt R. H., Coetzee M., Fettene M., (1998). The *Anopheles gambiae* complex: new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92: 231–235.
- Ishaaya, I., Horowitz, A. R., (1992) Novel phenoxy juvenile hormone analog (pyriproxyfen) supresses embryogenesis and adult emergence of sweetpotato whitefly. *Journal of Economic Entomology*, 85, 2113–2117.
- Josyline C., Kaburiae, Joyce N., Githutob, Muthamic L., Peter K. N., Jones M. M., Charles S. M., (2009). Effects of long-lasting insecticidal nets and zooprophylaxis on mosquito feeding behaviour and density in Mwea, central Kenya. *J Vector Borne Dis* 46, pp. 184–190.
- Klassen W., (2009). Introduction: development of the sterile insect technique for African malaria vectors. *Malar J*, **8** (Suppl 2):I1 doi: 10.1186/1475-2875-8-S2-I1.
- Lachance L. E., Schmidt C. H., Bushland R. C., (1967). Stérilité induite par la radiation, P. 147-96. Dans: W.W. Kilgore et R.L. Doult (eds.), contrôle des parasites: Méthodes chimiques biologiques, physiques et choisies. Édition académique, New York. 477 P.
- Legoff G., Randimby F. M., Rajaonarivelo V., Laganier R., Léong Pock Tsy J. M., Ceianu C. S., Duchemin J. B., Robert V., (2003). *Anopheles mascarensis* de Meillon 1947, vecteur de paludisme dans le Moyen-Ouest de Madagascar? *Arch Inst Pasteur de Madagascar*; 69 (1&2): 57-62

- Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M. S., Darriet F., Bergé J. B., Devonshire A. L., Guillet P., Pasteur N., Pauron D., (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *An. Gambiae* ss. *Insect Molecular Biology*, 7 (2), 179-184.
- Medlock J., Luz P. M., Struchiner C. J., Galvani A. P., (2009). The Impact of Transgenic Mosquitoes on Dengue Virulence to Humans and Mosquitoes. *The American Naturalist*, Vol. 174, No. 4, pp. 565-577.
- Michael A R, Marcelo J L., (2005). Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *ELSEVIER, Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35 (2005) 699–707.
- Mittal P. K, Adak T, Sharma V. P., (1991). Acute toxicity of certain organochlorine, organophosphorus, synthetic pyrethroid and microbial insecticides to the mosquito fish *Gambusia affinis* (Baird and Girard) *Indian J malariol* 1991, 28:167-170.
- Mosqueira B, Duchon S, Chandre F, Hougard J. M., Carnevale P., Mas-Coma S., (2010). Efficacy of an insecticide paint against insecticide-susceptible and resistant mosquitoes - part 1: laboratory evaluation. *Malar J* 2010, 9:340.
- Mouchet J., Camevale P., Coosemans M., Fontenille D., Ravaonjanahary C., Richard A., Robert V., (1993). Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers santé* 3 (4): 220-238.
- Najera J. A., Zaim M., (2002). Malaria Vector Control. Decision making criteria and procedures for judicious use of Insecticides. Document WHO/CDS/WHOPES/2002.5. World Health Organisation, Geneva.
- Namountougou M., Simard F., Baldet T., Diabaté A., Ouedraogo J. B., Thibaud M., Dabiré R K., (2012). Multiple Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* s.l. Populations from Burkina Faso, West Africa. *PLOS ONE* November 2012 Issue 11 e48412.
- N'guessan R., Darriet F., Guillet P., Camevale P., Traoré Lamizana M., Corbel V., koffia. A., Chandre F., (2003). Resistance to carbosulfan in *An. Gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 1-7.
- Ngufor C. N. G., Fagbohoun R., Odjo J., Malone D., Akogbeto M., Rowland M., (2014). Olyset Duo(R) (a pyriproxyfen and permethrin mixture net): an experimental hut trial against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* in Southern Benin. *Plos One*, 9:e93603.

- Ohashi K., Nakada K., Ishiwatari T., Miyaguchi J., Shono Y., Lucas J. R., Mito N., (2012). Efficacy of pyriproxyfen-treated nets in sterilizing and shortening the longevity of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 49(5):1052-1058.
- Ohba S. Y., Ohashi K., Pujiyati E., Higa Y., Kawada H., Mito N., Takagi M., (2013). The effect of pyriproxyfen as a population growth regulator against *Aedes albopictus* under semi-field conditions *plos One*, 8: e67045.
- Okumu F. O., Madumla E., John A., N., Lwetoijera D. W., Sumaye R. D., (2010). Attracting, trapping and killing disease transmitting mosquitoes using odor-baited stations. The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasites & Vectors*, 3:12.
- OMS: Organisation Mondiale de la Santé., (2012). Recommandation de politique générale de l'oms. Chimio-prévention du paludisme saisonnier pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone de forte transmission saisonnière dans la sous région du Sahel en Afrique.
- OMS. (2011). Statistiques sanitaires mondiales, 170p.
- OMS. (2010). Statistiques sanitaires mondiales.
- OMS. (2004). Lutte contre les vecteurs du paludisme et autres maladies transmises par des moustiques, OMS, Séries de rapports techniques, n° 857.
- Ranson H., N'Guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z., Corbel V., (2010). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.*
- Ravoahangimalala R. O., Rakotoarivony H. L., Legoff G., Fontenille D., (2003). Écoéthologie des vecteurs et transmission du paludisme dans la région rizicole de basse altitude de Mandritsara, Madagascar. *Bull SocPatholExot*, 96, 4, 323-328.
- Robert V., Gazin P., Boudin C., Molez J. F., Ouedraogo V., Carnevale P., (1985). La transmission de paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo Dioulasso (Burkina Faso). *Ann Soc belge Med trop*, 65: 201-214.
- Rossignol M., Lacroix M. N., Chandre F., (2011). Laboratory study of new lns from Sumitomo Chemical in tunnel tests. Institut de Recherche pour le Développement, DOC/LIN/IRD/08/11.
- Smith S. C., Uday B. J., Mark G., Joel S., Theresa N., Thomas A., (2007). Evaluation of Bed nets after 38 Months of Household Use in Northwest Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(Suppl 6), 2007, pp. 243–248.
- Tomlin C., (2000). The pesticide manual. 12th ed. British Crop Protection Council, London, United Kingdom.

- Tripet F., Jennifer W., Anthon C., (2007). Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(1), pp. 81–87.
- Tripet F., Touré Y. T., Taylor C. E., Norris D. E., Dolo G., Lanzaro G. C., (2001). DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*, 10(7): p. 1725-32.
- Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M., (2004). The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*. 13(1): 1-7.
- Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M., (2003). Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature (Lond)*. 423: 136-137.
- WHO: World Health Organization, (2014). World Malaria report 2014.
- WHO. (2012). Global Plan for Insecticide Resistance Management.
- WHO. (2009). World Malaria report 2009.
- WHO. (2006). Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP/2006.32006.
- WHO. (2006). Specifications and evaluations for public health pesticides: Pyriproxyfen. Geneva.
- WHO. (2005). Guideline for laboratory and field testing of long lasting mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11.
- WHO. (2001). Report of the fourth WHOPES working group meeting. Review of: IR3535; KBR3023; (RS)-methoprene 20% EC; pyriproxyfen 0.5% GR and lambda-cyhalothrin 2.5% CS. Document WHO/CDS/WHOPES/2001.2. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2000). Severe *P. Falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene*, 94, suppl 1,90p.
- WHO. (1984). Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors. Mimeogr. Doc. TDR/BCV/SWG/84.3 33pp.
- Zaim M., Aitio A., Nakashima N., (2000). Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 2000, 14:1-5.

ANNEXES

Annexe 1: Protocole de lavage des échantillons de moustiquaire

Avant d'être mises sur le marché, les moustiquaires imprégnées d'insecticides doivent être testées et recevoir une autorisation de leur mise sur le marché par le WHOPEP. Une des exigences est que les moustiquaires, après 20 lavages devraient pouvoir être toujours efficace en termes de Knock-down et de mortalité (KD). La première phase de test se déroule au laboratoire. Il est important de standardiser le lavage pour faciliter la comparaison des résultats des différents tests. Pour réaliser cela, le WHOPEP a inclus un protocole de lavage dans le livret directif pour les tests de moustiquaires. Cet SOP est basé sur le protocole de WHOPEP et décrit la procédure pour le lavage des échantillons de moustiquaires imprégnées.

Matériel

- Un meublé, un bain mari ;
- Des bouteilles de 0,5L ;
- L'eau de robinet ;
- L'eau déminéralisée ;
- Un savon de Marseille ;
- Une râpeuse ;
- Une balance.

Considérations de Sécurité

- Un labcoat et des gants à usage unique doivent être portés avant de manipuler les moustiquaires imprégnées d'insecticide.
- Lire la fiche technique du matériel de sécurité avant de manipuler n'importe quel nouvel insecticide.

Mode opératoire

a. Préparation du matériel

- Râper le savon (savon de Marseille) à l'aide d'une râpeuses ;
- Peser le savon râpé à l'aide d'une balance selon la taille de l'échantillon, soit pour un échantillon de (25cmx25cm) 2g/l de savon à (pH = 10-11) ;
- Mesurer la quantité d'eau déminéralisée à utiliser selon le nombre d'échantillon à laver ;



- Prélever une petite quantité de l'eau mesurée, la chauffer pour dissoudre le savon pesé, après totale dissolution, faire le mélange avec la quantité d'eau restante, le mélange doit avoir une $T^{\circ}\text{C} \leq 30^{\circ}\text{C}$;
- Mettre la machine en marche, ajouter de l'eau jusqu'à immerger les supports des bouteilles, attendre que la $T^{\circ}\text{C}$ se stabilise à 30°C ;
- Mesurer la quantité d'eau savonneuse correspondante dans les différentes bouteilles soit 0,5l dans les bouteilles d'un litre et 350mL dans les bouteilles de 0,5L ;

b. Procédure de lavage

- Introduire l'échantillon de la moustiquaire dans la bouteille, s'assurer qu'il est totalement immergé dans l'eau en renversant les bouteilles bien fermées ;
- Introduire les bouteilles dans la machine de sorte qu'il y ait un équilibre ;
- Mettre l'agitation de la machine en marche ;
- laisser agiter pendant 10mn ;
- à la fin des 10mn faire sortir les bouteilles et vider l'eau savonneuse ;

c. Rinçage

- Réintroduire la même quantité d'eau déminéralisée propre dans les bouteilles contenant les échantillons de moustiquaires pour le rinçage ;
- Remettre les bouteilles contenant l'eau propre dans la machine pendant 10mn ;
- à la fin des 10mn, faire sortir les bouteilles et vider l'eau ;
- Remettre la même quantité d'eau déminéralisée dans les bouteilles contenant les moustiquaires pour un deuxième rinçage ;
- Effectuer deux rinçages par lavage ;

d. séchage et conservation

- après le deuxième rinçage, les moustiquaires sont sorties des bouteilles et étalées dans un lieu clos à environ 30°C de $T^{\circ}\text{C}$ pour séchage (fin de lavage).
- Après séchage les échantillons sont emballés dans du papier aluminium bien étiquetés et rangés dans un endroit convenable pour les différents tests.

NB : ces opérations sont répétées selon le nombre de lavage que l'on souhaite réaliser.

c. Nettoyage de la machine

Après que le lavage soit terminé, la machine est vidée de l'eau qu'il contient en ouvrant ou en desserrant la prise par l'arrière pour laisser drainer l'eau.

Annexe 2: Protocole du test en cône

Principe du test

Le principe de ce test est basé sur l'évaluation sur des moustiques adultes de l'efficacité et la rémanence d'un insecticide sur un substrat donné : tissu, tulle moustiquaire, terre, bois, etc . c'est également un outil approprié pour tester la résistance au lavage de formulations insecticides sur différents types de substrats en tissu. Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un pyréthrianoïde, en terme de mortalité et d'effet Know Down (effet KD). Cette évaluation simultanée du KD et de la mortalité permet ainsi d'apprécier la biodisponibilité de l'insecticide sur le substrat.

Les cônes standardisés par l'OMS sont en PVC, une matière sur laquelle les moustiques ont des difficultés à se poser, ce qui favorise le contact entre les moustiques et le substrat. Ce dispositif permet ainsi de s'assurer que les tarse du moustique sont bien en contact avec le support traité tout au long de l'exposition.

Matériel

- Cône en PVC de l'OMS ;
- Deux plaques de plexiglas transparent 24 x 27 cm percées de quatre trous de 95 mm de diamètre pour tester des moustiquaires ou des tissus ;
- Un aspirateur à bouche ;
- Fiche de test cône.

Mode opératoire

- Préparer en premier le support témoin, puis les supports recevant les échantillons traités ;
- Placer la moustiquaire ou le tissu (25 x 25 cm) entre les deux plaques de plexiglas transparent comportant quatre trous à l'emplacement exact où doivent se trouver les cônes ;
- Maintenir l'ensemble bloqué avec des pinces double clips ;
- Placer les supports sur un support oblique (métallique ou en bois) recouvert de papier aluminium ;
- Fermer avec un bouchon en polyéthylène l'orifice supérieur des cônes (ouverture sur l'extérieur).

- Tous les renseignements sont notés sur la fiche de test « test en cône ». Le temps d'exposition des moustiques (à jeun et âgés de 2 à 5 jours, généralement des femelles) est, selon les supports, de 3mn (moustiquaire) avec 5 individus ou de 30 mn (autre substrat) à raison de 15 individus par cône.
- Pendant toute la durée de l'exposition, les cônes sont maintenus sous une lumière. A la fin du temps d'exposition, les moustiques sont transférés dans les gobelets pourvus de coton imbibé de glucose (5%). Après chaque série de test il est indispensable de procéder à la décontamination du plan de travail. Au cours des différentes manipulations tous les produits ou supports testés doivent être identifiés au moyen d'une étiquette rappelant le numéro d'identification du produit et sa référence échantillon.
- Si au besoin le taux de KD est noté à intervalle régulier ou après 30 ou 60 mn. Les moustiques sont ensuite placés en observation dans l'obscurité pendant 24 heures à une température maintenue entre 26 et 30°C et une humidité maintenue entre 70 et 80%.
- Après ce délai le nombre d'individus morts et morts fonctionnels sont comptés et enregistré sur la fiche.
- Conserver les moustiques morts ou vivants sous silicagel ou dans l'alcool (70°C) pour des analyses PCR.

Critère d'acceptabilité

En plus du témoin négatif (support non imprégné), un témoin positif peut être utilisé si besoin y est. Pour que le test soit validé, il faut que la mortalité chez les témoins négatifs soit inférieure à 20%. Lorsque celle-ci est comprise entre 5 et 20%, la mortalité des traités doit être corrigée selon la formule d'Abbott ; si elle est inférieure à 5% le test est valide. Lorsque cette mortalité est supérieure à 20%, le test n'est pas validé et doit être recommencé. Il est alors impératif de déterminer la cause de cette mortalité anormale avant de reprendre l'expérimentation. La mortalité dans les témoins positifs doit être comprise entre 95 et 100%.

$$\text{Formule d'Abbott } Mc = \frac{\% \text{ mortalités traités} - \% \text{ mortalité témoins}}{100 - \% \text{ mortalité témoins}} \times 100$$

Annexe 3: Protocole de lavage manuel des moustiquaires entières pour les cases expérimentales.

Contexte:

L'essai des cases expérimentales est utilisé pour évaluer l'efficacité et l'impact d'une LN sur les moustiques sauvages en vol libre. L'impact de la LN lavée et non lavée sur l'inhibition de l'effet du repas de sang, la mortalité et la répulsion des moustiques est évalué. Si on estime qu'une moustiquaire sera lavée 20 fois dans sa vie utile (4 fois par an de 5 ans). Selon les lignes directrices du WHOPEP, une moustiquaire doit être efficace après 20 lavages avant d'être certifiée comme un filet à longue durée.

But:

Ce mode opératoire est spécifiquement conçu pour guider le lavage des LN pour l'évaluation sur le terrain dans des cases expérimentales.

Equipements :

- bassine de lavage (Alluminium);
- l'eau froide (deminéralisée);
- une spatule en bois;
- savon de Marseille.

Procédure

Préparation de matériaux

- Verser 10 litres d'eau déchlorée dans la bassine de lavage ;
- Peser 20 g de savon de Marseille, les dissoudre dans l'eau de la bassine. L'objectif est de préparer une solution de savon de 2g/l ;
- Préparez une bassine pour chaque LN à laver.

Procédure de lavage

- sortez le LN de son emballage;
- immerger le LN complètement dans la solution savonneuse;
- utiliser le spatule en bois pour agiter (agitation manuelle), la LN dans la solution de savon à 20 rotations par minute pendant 10 minutes ;
- à la fin des 10mn, retirer la LN de la solution de savon ;
- rincer la LN deux fois dans 10L d'eau déchlorée propre. Agiter à 20 rotations par minute pendant 10 minutes pour chaque rinçage.

Le séchage de LN lavé

Après rinçage, la LN est retirée de l'eau et séché horizontalement sur une natte ou une matière en plastique) sous un hangar à l'abri de la lumière.

Après séchage, la moustiquaire doit être conservée à la température ambiante entre les lavages. Entre deux lavage le temps de régénération doit être observé. Par exemple, pour la moustiquaire Olyset, le temps de régénération de la perméthrine dans les fibres est de 7 jours donc la LN doit être lavé à intervalles de 7 jours jusqu'atteindre les 20 lavages.

Annexe 4: Protocole du test en tunnel

Principe du test

Le principe du test en tunnel est basé sur l'évaluation de la sensibilité des moustiques aux moustiquaires imprégnées d'insecticides. Les moustiques sont regroupés dans huit catégories suivant plusieurs états (gorgés ou non gorgés, vivants ou morts, d'un côté ou de l'autre de la moustiquaire imprégnée):

- gorgés vivants – petit compartiment ;
- gorgés vivants – grand compartiment ;
- gorgés morts petit compartiment ;
- gorgés morts grand compartiment ;
- non gorgés vivants petit compartiment ;
- non gorgés vivants grand compartiment ;
- non gorgés morts petit compartiment ;
- non gorgés morts grand compartiment.

Les paramètres recherchés au cours de l'analyse:

- la mortalité due à l'insecticide par détermination des moustiques morts (gorgés ou non gorgés), d'un côté ou de l'autre de la (paroi) moustiquaire) ;
- le degré de protection individuelle (PI) par détermination du nombre de moustiques gorgés (vivants ou morts, d'un côté ou l'autre de la paroi moustiquaire) ;
- le degré de protection collective (PC) par détermination du nombre de moustiques gorgés vivants d'un côté ou de l'autre de la (paroi) moustiquaire.

Dans une moindre mesure, ces huit catégories de moustiques peuvent donner une indication sur le degré minimum d'irritabilité/répulsivité de l'insecticide par détermination du nombre de moustiques récoltés à l'extérieur de la (paroi) moustiquaire.

Matériel

- Un tunnel en verre rectangulaire de 25 cm par 25 cm de section et de 60 cm de longueur ;
- Un cadre en carton de 25 cm sur 25 cm ;
- Deux armatures métalliques cubiques ;
- Deux tulles moustiquaires tubulaires ;
- Moustiques femelles nullipare âgées de 5 à 7 jours.

Mode opératoire

Le tunnel est divisé en deux compartiments séparés au deuxième tiers de sa longueur par des rails en aluminium. Une fente sur la partie supérieure du tunnel permet de glisser le cadre en carton plume.

- Préparer un cadre en carton plume dont les dimensions extérieures correspondent à celles des rails du tunnel qui recevra ce cadre.
- Découper l'intérieur aux dimensions voulues pour la manipulation (généralement 20 x 20 cm).
- Placer le tulle moustiquaire imprégné d'insecticide et percé de 9 trous (1cm de diamètre) à tester entre le carton plume et le sur cadre. Fixer l'échantillon à tester en l'agrafant avec le cadre.
- Fermer les bords avec du ruban adhésif afin de leur permettre de s'insérer dans les rails. Préparer dans des gobelets fermés par un tulle moustiquaire cent femelles de moustiques âgées de 5 à 7 jours n'ayant pas pris de repas de sang. Monter les tulles moustiquaires à chaque extrémité du tunnel. Les maintenir en place au moyen d'élastique. Mettre en place le cadre en carton plume contenant la moustiquaire dans le tunnel entre les armatures métalliques.
- Le test se déroulera toute la nuit, le lancement doit donc se faire à partir de 17h00.
- Disposer le cobaye maintenu en contention dans une cage grillagée dans le petit compartiment. Introduire les moustiques dans le grand compartiment. Après une nuit (18h00 – 9h00) passée dans un environnement chaud et humide (28°C et 70 à 80% d'humidité), le lendemain matin les femelles sont aspirées dans les deux compartiments et classées selon les huit catégories décrites précédemment.

NB : des tunnels témoins sont toujours associés aux traités.

Critères d'acceptation

Pour que le test soit validé, il faut que la mortalité chez les témoins soit inférieure à 20%, et leur taux de gorgement supérieur à 45%.

Annexe 5: Protocole d'évaluation des moustiquaires en cases expérimentales

1. Principe du test

Le test en cage piège est un essai sur le terrain à petite échelle (phase II). Il s'agit d'étudier l'efficacité de la moustiquaire en termes d'inhibition de repas de sang, la dissuasion, exophilie induite et la mortalité dans les cases expérimentales des moustiques en vol libre ou des lâchers recaptures de moustiques dans les cases.

2. Matériel

- Les cases pièges avec leur rigoles remplies d'eau afin d'éviter l'entrer des fourmies dans les cases ;
- Les moustiquaires imprégnées et non imprégnées (contrôle), lavées ou non lavées ;
- Des glacières selon le nombre de cases utilisées ;
- Des tubes de capture ;
- Des sacs de capture bien étiquetés (sac de capture case, véranda-piège, sous moustiquaire) les sacs doivent servir dans la même case ;
- Une torche ;
- Des nattes ;
- Un réveil ;
- Des captureurs.

3. Préparation du test

Les cases sont soigneusement nettoyées et aérées pour éliminer les contaminations potentielles dans la journée du test. Préparer les moustiquaires à tester ; si elles doivent être trouées, les trouer (y compris le contrôle) en six trous (4cm x 4 cm) au total ; découpées à l'aide des ciseaux bien aiguisés pour simuler les conditions d'une moustiquaire déchirés (deux trous sur chaque grand côté et un sur chaque petit côté). Attacher les moustiquaires dans les cases au dessus du matériel à coucher. Les volontaires recrutés comme étant les captureurs doivent se présenter à la station à 19h 30mn. Ils vérifient avec les responsables (techniciens) de l'étude le trousseau de capture (matériel cité si haut) et leur rappeler les différents consignes. Les captureurs avant d'entrer dans les cases à 19h55mn avec les glacières contenant tout le matériel de capture sont tirés au sort selon le nombre de cases. Dans les cases ils disposent les glacières aux coins des maisons, ouvrent les chicanes de l'intérieur, relèvent les rideaux des vérandas et déposent les sacs moustiquaires, les torches et les réveils

à côté des nattes, les sacs cases dans les cases et les sacs véranda-piège dans les vérandas-piège. Le superviseur ouvre les chicanes de l'extérieur à 20h00.

4. Déroulement du test

A 20h00mn, les captureurs se couchent sous la moustiquaire et la fourre sous la natte. Le superviseur doit veiller au bon déroulement de ces activités et au respect strict des horaires. Il est chargé de vérifier toute au long de la nuit que les captureurs respectent les consignes, évitent de trop sortir de la case et dorment effectivement sous les moustiquaires.

A 5h30mn, le superviseur ferme les chicanes de l'extérieur et réveille les captureurs.

- Au réveil ces derniers capturent en premier lieu les moustiques vivants puis morts entrés éventuellement sous la moustiquaire et mis dans le sac moustiquaire ;
- Puis ils quittent avec précaution la moustiquaire, ferment les rideaux séparant la case de la véranda, ferment les chicanes de l'intérieur et capturent tous les moustiques (morts puis vivants) présents dans la case et mis dans le sac case ;
- Ils passent avec précaution dans la véranda et capturent tous les moustiques (morts puis vivants) présents dans la véranda et mis dans le sac véranda ;
- Ils finissent leur travail en par un second passage dans la case puis dans la véranda où ils vérifient bien qu'ils ont capturé tous les moustiques morts et vivants ;
- Après cela tous le matériel (les différents sacs, le reste des tubes, les torches) sont déposés dans les glacières ;
- Les techniciens et le superviseur vérifient si la capture a été bien faite en inspectant minutieusement l'intérieur de la maison ;
- Avant de quitter, les cases sont balayées proprement pour la nuit suivante, les portes et les chicanes fermés jusqu'à la nuit suivante.

NB : les captureurs tournent d'une case à une autre dans le but d'éviter l'effet l'attraction des moustiques par un captureur donné.

5. Identification des espèces et mise en observation des moustiques vivants

- Les techniciens et le superviseur récupèrent les glacières à 7h30mn le matin et vérifient que le matériel est complet et en bon ordre de marche. Ils vérifient avec le dormeur/captureur le bon état de la case, son nettoyage et le déroulement satisfaisant des activités. Ils vérifient également que les moustiquaires sont restées pendantes dans les cases.
- Rentrer immédiatement au laboratoire avec les glacières,

- Identifier et compter les moustiques capturés avec les fiches de capture selon différents niveaux :
 - Le lieu de capture (moustiquaire, case, véranda),
 - L'état physiologique (à jeun ou gorgé),
 - L'état de survie (mort ou vivant).
- Pour les vecteurs du paludisme (*An. gambiae* sl *An. funestus*, *An. nili*), les moustiques vivants sont placés suivant les différents lieux de capture dans des gobelets avec du jus sucré au laboratoire pour observation pendant 24h, compter après la mortalité différée. Au bout de 24h d'observation, les moustiques morts sont cochés dans la colonne « mort différée ». La mortalité totale est le cumule des deux (immédiate et différée).
- Pour les vecteurs du paludisme (*An. gambiae* sl *An. funestus*, *An. nili*), des lots de moustiques sont constitués par espèces, par jour, par case et par niveaux ; conserver dans des microtubes bien étiquetés contenant du silicagel recouvert de coton. Ces microtubes sont regroupés par jour dans des sachets journaliers qui seront à leur tour regroupés dans des sacs mensuels bien étiquetés et conservés au congélateur à – 20°C pour des analyses ultérieures.

Design de rotation des moustiquaires

1 à 7 désigne les différents traitements à utiliser dans les cases

Numéro des cases	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7
Période 1	1	2	3	4	5	6	7
Période 2	2	3	4	5	6	7	1
Période 3	7	1	2	3	4	5	6
Période 4	3	4	5	6	7	1	2
Période 5	6	7	1	2	3	4	5
Période 6	4	5	6	7	1	2	3
Période 7	5	6	7	1	2	3	4

Design de rotation des dormeurs/captureurs dans les différentes cases

S1 à S7 design les différents dormeurs/captureurs

Numéro des cases	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7
Jours 1	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Jours 2	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S1
Jours 3	S3	S4	S5	S6	S7	S1	S2
Jours 4	S4	S5	S6	S7	S1	S2	S3
Jours 5	S5	S6	S7	S1	S2	S3	S4
Jours 6	S6	S7	S1	S2	S3	S4	S5
Jours 7	S7	S1	S2	S3	S4	S5	S6