

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



N° d'ordre.....

THESE
Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

(DOCTORAT UNIQUE)

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Par

MAIGA Hamidou

**Etude de la bio-écologie des mâles d'*Anopheles gambiae s.l.* et
optimisation des méthodes d'élevage dans une perspective de
développement de la lutte génétique**

Soutenue publiquement le 04 Avril 2015 devant le jury composé de :

Président : - Pr. Adrien Marie Gaston BELEM, Professeur Titulaire, UPB

Membres : - Pr. Antoine SANON, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou

- Dr. Roch Kounbobr DABIRE, Directeur de Recherche, IRSS/Centre Muraz

- Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO, Professeur titulaire, UPB (Co-directeur de thèse)

- Dr. Abdoulaye DIABATE, Maître de Recherche, IRSS/CNRST (Directeur de thèse)

DEDICACES

Au **Seigneur**, le miséricordieux

A mon père, **Bonkaney K. MAIGA**

A ma mère, **Djénéba DICKO**

A mon **épouse** et à ma **fille**

A toute **la famille**

A mes **amis**

.

REMERCIEMENTS

Ce travail, fruit de trois années, s'est déroulé au Burkina Faso à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) / Centre Muraz et à la Division mixte de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et de l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (FAO/AIEA) à Seibersdorf, en Autriche.

Cette thèse n'aurait pu se concrétiser sans l'appui du **Projet MRC/DfID African Research Leadership Award (Grant ID 97014)** accordé au **Dr. DIABATE Abdoulaye**, l'encadrement du **Dr. Jérémie Gilles** et le concours de plusieurs personnes auxquelles j'ai le réel plaisir d'exprimer ma profonde gratitude. Je me dois de remercier:

Le Dr. Abdoulaye DIABATE,

Pour m'avoir proposé ce thème passionnant sur l'écologie des moustiques mâles quand beaucoup de gens s'intéressent plutôt aux femelles, principales vectrices du paludisme. Merci Dr., pour avoir accepté de diriger ce travail avec rigueur et disponibilité malgré vos multiples occupations. Vos connaissances scientifiques et vos qualités de chercheur m'ont permis de bénéficier pleinement de votre expérience dans le domaine de l'Entomologie. Vos qualités humaines, votre modestie, votre humour, votre amour pour l'excellence et votre facilité à captiver les gens sont sans doute le secret de votre réussite aujourd'hui. Vous avez été plus qu'un modèle. Ma seule peur est de ne pouvoir faire mieux que vous en apportant au moins autant à ma patrie et au delà au monde de la science. L'enjeu est de taille et je sais que c'est tout le mal que vous me souhaiteriez. Votre soutien a été inestimable dans la réalisation de ce travail. Je suis reconnaissant quant aux moyens matériels et scientifiques mis à ma disposition. Je remercie les cieux de vous avoir croisé. Merci du fond du cœur pour la confiance que vous m'avez toujours accordée.

Le Dr. Jérémie Gilles,

Pour m'avoir accueilli et encadré dans votre laboratoire, pour vos conseils, votre disponibilité malgré vos multiples tâches. Merci pour cette ambiance que vous avez toujours su maintenir au laboratoire durant mes trois séjours à Seibersdorf, Autriche. Au delà de ma personne, merci pour tout le soutien que vous continuez d'apporter aux jeunes étudiants africains. Ce sera toujours un plaisir de travailler avec vous. Un très grand merci pour la confiance que vous m'avez toujours accordée. Merci au 'Mosquito Team', à **David, Sharon,**

Hanano, et **Odessa** qui m'ont beaucoup aidé au cours de mon séjour au laboratoire IPCL à Seibersdorf. Merci David pour le vélo, les chocolats et surtout pour les critiques constructives. Une mention spéciale à **Rosemary Susan Lees** pour avoir édité la quasi-totalité de mes articles publiés ou en préparation. **Rosemary** 'thanks so much, I appreciated'. Je remercie enfin toute l'Equipe **IPCL** à travers son Chef **Marc Vreysen**, pour m'avoir accueilli.

Le **Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO**, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, pour avoir initié le 3^e cycle de Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques à Bobo-Dioulasso. Merci Pr. pour avoir accepté de codiriger cette thèse malgré votre calendrier hyper-chargé. Hommages respectueux.

Le **Pr. Jean-Bosco OUEDRAOGO**, 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 votre institution.

Le **Pr. Robert T. GUIGUEMDE**, ex-Chef du Département Parasitologie et Entomologie du Centre Muraz pour m'avoir intégré dans votre équipe pendant mon stage de thèse.

Le **Pr. Roch K. DABIRE**, Chef du Département Maladies Transmissibles du Centre Muraz pour vos conseils et suggestions. Merci pour avoir guidé mes premiers pas dans la Recherche scientifique. Vous ne vous laissez jamais de nous remettre sur les 'rails'. Merci pour votre disponibilité.

Aux **Pr. Antoine SANON, Dr. Thierry Baldet et Dr. Malick BA** pour m'avoir honoré d'être rapporteurs de ma thèse. Merci pour vos suggestions. Hommages respectueux.

Le **Pr. Frédéric SIMARD**, pour les multiples conseils et encouragements et pour votre grande générosité. Ce fut une chance pour bon nombre d'entre nous de vous avoir côtoyé durant votre séjour au Burkina Faso.

Le **Dr. Léa PARE/TOE**, pour vos multiples conseils, preuve de l'intérêt que vous avez porté à notre formation.

Le **Dr. Zekiba TARNAGDA** pour vos conseils permanents sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) à l'IRSS.

Les **Docteurs Louis Clément GOUAGNA, Olivier ROUX, Amelie VANTAUX, Thierry LEFEVRE, Florence FOURNET, Karine MOULINE, Serges YERBANGA, Anna COUHET et Cécile BRENGUE**, pour votre disponibilité. Merci pour vos soutiens multiformes.

Les **Docteurs Hamidou ILBOUDO et Michel KERE**, pour votre amitié sincère, votre complicité et pour m'avoir encouragé à embrasser ce noble métier qu'est la Recherche scientifique.

Les **Docteurs Moussa, Simon, Jacques, Mamaï, Sangaré, Robert, Bienvenu, Emilie, Ernest, Cyrille Ndo, Fabrice, Dah** pour les conseils et pour l'amitié.

Tout le **Personnel** de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS/Bobo), pour l'accueil et l'appui apporté. Mention spéciale à tous les **TECHNICIENS** de l'IRSS en général et de l'**ENTOMOLOGIE** en particulier avec qui j'ai beaucoup appris à travers le travail abattu sur le terrain comme au laboratoire. 'Big up à l'Equipe Mob TAMVEC'. Merci à l'administration pour avoir facilité mes multiples services. Mille fois Merci.

Tous mes **camarades étudiants** de l'IRSS/Centre Muraz, pour la bonne ambiance au laboratoire, au bureau et sur le terrain de football. Merci à vous tous.

Mes deux 'super'complices **Kafou et Ousmane**, pour la longue traversée du désert ensemble et pour le soutien que vous n'avez jamais cessé de m'apporter. Merci pour avoir cru en moi.

Mes amis de Vienne, en Autriche, **Turama, Fofana, Karim, Lopez, Briand, Le Bicongo et le Naaba Karim Kiemdé**. Merci pour tout. Un grand merci à **Bado Souleymane et famille** pour votre générosité.

Ma famille, particulièrement mon aîné **Ousmane dit Bandé** et sa famille, ma sœur **Haoua dite Bébé** et époux et mon frère **Abdoul-Moubarack**, pour vos prières et bénédictions.

Mon épouse, **Kady** et ma fille, **Firdaws Omnia** pour le soutien et pour avoir supporté mes absences répétées.

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.

'Il n' ya pas de secret pour réussir; c'est le fruit de l'apprentissage du travail acharné et des leçons tirées de l'échec'

Colin Luther Powell

TABLE DES MATIÈRES

Dédicaces	I
Remerciements	II
Table des matières	VI
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XIII
Liste des annexes.....	XIV
Sigles et abréviations.....	XV
Publications et communications.....	XVI
Résumé.....	XVIII
Abstract	XIX
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1.1. Le complexe <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	8
1.2. Bio-écologie des anophèles.....	8
1.2.1. Cycle de développement des anophèles.....	8
1.2.2. Le comportement trophique et de reproduction des anophèles	12
1.3. La lutte contre le paludisme	14
1.3.1. La lutte antivectorielle actuelle	15
1.3.2. Autres méthodes de lutte	16
1.3.3. Concept de la lutte génétique	16
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE GENERALE	19
2.1. Cadre de l'étude	20
2.2. Sites d'études	21
2.2.1. La Vallée du Kou (VK7).....	21
2.2.2. Soumousso	22
2.3. Echantillonnage de moustiques et techniques au laboratoire.....	23
2.3.1. Terrain : collecte de moustiques en milieu naturel.....	23
2.3.2. Travaux de laboratoire.....	26

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	38
PARTIE 1 : Rôle des réserves nutritionnelles et de la taille des mâles sur le comportement d’essaimage et d’accouplement chez <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i> en condition naturelle	39
1.1. Introduction	39
1.2. Méthodologie	40
1.3. Résultats	40
1.3.1. Variations des réserves énergétiques en fonction du temps et de l’activité des mâles	40
1.3.2. Budget énergétique des mâles des essaims d’ <i>An. coluzzii</i> et d’ <i>An. gambiae</i>	43
1.3.3. Réserves énergétiques des mâles accouplés et non accouplés dans les essaims	45
1.3.4. Implication de la taille des ailes dans le choix du partenaire sexuel et du succès à l’accouplement.....	45
1.3.5. Symétrie des ailes des mâles accouplés et non accouplés dans les essaims	47
1.4. Discussion	48
1.4.1. Variations des réserves énergétiques en fonction du temps et de l’activité des mâles	48
1.4.2. Budget énergétique des mâles des essaims d’ <i>An. coluzzii</i> et d’ <i>An. gambiae</i>	50
1.4.3. Réserves énergétiques des mâles accouplés et non accouplés dans les essaims	51
1.4.4. Taille et symétrie des ailes du mâle	51
1.5. Conclusion partielle	52
PARTIE 2 : Evaluation de l’impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d’<i>Anopheles coluzzii</i>	54
2.1. Introduction	54
2.2. Méthodologie	54
2.2.1. Préparation des diètes	54
2.2.2. Exposition des larves aux différents traitements	56
2.2.3. Mesure des traits d'histoire de vie.....	56
2.3. Résultats	58
2.3.1. Impact du régime alimentaire sur la durée de développement larvaire	58
2.3.2. Impact du régime alimentaire sur le taux d’émergence.....	60
2.3.3. Impact du régime alimentaire sur la taille des ailes	62
2.4. Discussion	64

2.4.1. Impact du régime alimentaire sur le temps de développement larvaire.....	64
2.4.2. Impact du régime alimentaire sur le taux d'émergence.....	64
2.4.3. Impact du régime alimentaire sur la taille des ailes	65
2.5. Conclusion partielle	66
PARTIE 3 : Standardisation de l'élevage en masse d'anophèles au laboratoire: du traitement des œufs a l'obtention des adultes.....	68
3.1. Introduction	68
3.2. Méthodologie	69
3.2.1. Elevage et collecte des œufs.....	69
3.2.2. Technique de séchage et de pesage des œufs d'anophèles	69
3.2.3. Validation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs	71
3.2.4. Effet de la méthode d'estimation du poids sec des œufs sur le taux d'éclosion.....	71
3.2.5. Effet du séchage sur les traits d'histoire de vie des moustiques.....	71
3.2.6. Autre méthode de séchage: effets sur l'estimation du poids sec et sur le taux d'éclosion	73
3.2.7. Adaptation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs à la cage de production de masse.....	73
3.2.8. Production de masse de pupes	73
3.2.9. Amélioration de la production de masse d'œufs.....	74
3.3. Résultats	76
3.3.1. Estimation du poids sec	76
3.3.2. Validation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs	77
3.3.3. Effets de la méthode d'estimation du poids sec des œufs sur le taux d'éclosion.....	78
3.3.4. Effet du séchage sur les traits d'histoire de vie des moustiques.....	78
3.3.5. Autre méthode de séchage: effets sur l'estimation du poids sec et sur le taux d'éclosion	80
3.3.6. Adaptation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs à la cage de production de masse.....	80
3.3.7. Production de masse de pupes	81
3.3.8. Amélioration de la production de masse d'œufs.....	81
3.4. Discussion	82
3.5. Conclusion partielle	85

PARTIE 4 : Compétitivité sexuelle des mâles stériles de moustiques en grandes cages de laboratoire.....	86
4.1. Introduction	86
4.2. Méthodologie	87
4.2.1. Technique de stérilisation.....	87
4.2.2. Tests de compétitivité sexuelle des mâles en grandes cages en serre expérimentale	88
4.2.3. Analyse de la compétition en fonction du temps de contact.....	89
4.3. Résultats	89
4.3.1. Compétitivité des mâles d' <i>An. Coluzzii</i> irradiés.....	89
4.3.2. Influence du temps de contact entre les mâles et les femelles	91
4.4. Discussion	92
4.5. Conclusion partielle	95
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	100
ANNEXES.....	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle biologique de l’anophèle (<i>Boussès Ph</i>)	9
Figure 2 : Anatomie de la larve d’anophèles (<i>Manuel formation, RTI International</i>)	10
Figure 3 : Pupes femelle (gauche) et mâle (droite) <i>An. gambiae</i> . Les cercles indiquent la différence au niveau du genitalia de la femelle (plus court) et du mâle (plus allongé) (Photo M. Fraiture)	11
Figure 4 : Femelle (gauche) et mâle (droite) adultes <i>An. gambiae</i> (Photo M. Fraiture)	11
Figure 5 : Les phases du cycle biologique des femelles d’anophèles, d’après <i>International Water Management Institute</i>	13
Figure 6 : Les phases du cycle biologique des mâles sexuellement matures d’anophèles: A : Repos diurne à l’intérieur, B: Activation des antennes 1 heure avant l’essaimage, C : départ pour les sites d’essaimage, D : Repas sucré après l’essaimage avant le site de repos à l’intérieur des maisons. (Howell et Knols, 2009).....	14
Figure 7 : Localisation des sites d’étude et zones climatiques au Burkina Faso	21
Figure 8 : Site d’étude de la Vallée du Kou (VK7).....	22
Figure 9 : Site d’étude de Soumousso	23
Figure 10 : Cage d’éclosion des moustiques du terrain (Photo G Gimonneau)	24
Figure 11 : Capture de moustiques en faune résiduelle (Photo MH).	24
Figure 12 : Essaimage en cours où des couples de moustiques se forment (Photo PS Sawadogo).....	25
Figure 13 : Fauchage de mâles et de couples de moustiques dans les essaims à l’aide d’un filet-fauchoir (Photo MH).	25
Figure 14 : Mixture de 5 g de poudre de thon, de 5g de poudre de foie de bœuf et de 4,6g de complexe de vitamines dilués dans 1 litre d’eau distillée développée par l’AIEA pour l’alimentation des larves d’anophèles	27
Figure 15 : Plateau individuel (100 x 60 x 3 cm) (A) et Rack (B) portant 50 plateaux à larves sur une surface d’1m ² pour la production de masse. Estimateur gradué à 500 et 1 000 pupes (C).....	28
Figure 16 : Cage de production de masse d’œufs : ancien prototype (A), nouveau prototype (B), toile noire recouvrant la moitié supérieure du nouveau prototype de la cage (C)	29
Figure 17 : Système de tamisage (A), à l’aide de tamis de différentes tailles (B) pour séparer les œufs (C) des adultes morts (D).....	30

Figure 18 : Dispositif de nourrissage au sang : A. Une membrane en collagène de 20 x 20 cm fixée autour de la plaque chauffante en aluminium avec un anneau en plastique. B. Injection de 50 ml de sang entre la plaque en aluminium et la membrane à l'aide d'une seringue (Damiens <i>et al.</i> 2013b).....	31
Figure 19 : Aile d'un moustique. La double flèche indique la mesure effectuée entre l'alula (extrémité gauche de la flèche) et l'extrémité distale de l'aile excluant les franges (extrémité droite de la flèche) (Coetzee <i>et al.</i> 2013).	32
Figure 20 : Spermathèque positive libérant son contenu (Photo MH).....	32
Figure 21 : Dosage des métabolites. (A) broyage du moustique, (B) centrifugation, (C) dosage sous hotte aspirante et, (D) lecture au spectrophotomètre Thermo Multiskan (Photo MH).	34
Figure 22 : Dosage d'un métabolite. L'intensité de la coloration du puits est fonction de la concentration. Pour chaque type de métabolite, 300 µl de l'échantillon ont été mis en répliques sur des plaques de 96 puits.	37
Figure 23 : Comparaison des réserves énergétiques des mâles nouvellement émergés (Emerg), des mâles au repos (matin + soir) et dans des essais (pic).....	42
Figure 24 : Budget énergétique (sucres totaux (A et B) et glycogène (C et D)) des mâles (collectés au début (F1), au pic (F2) et à la fin de l'essaimage (F3)) d' <i>An. coluzzii</i> (A et C) et d' <i>An. gambiae</i> (B et D). Les mâles d' <i>An. coluzzii</i> et d' <i>An. gambiae</i> ont été collectés respectivement à VK7 et à Soumouso. Les graphes du même groupe ayant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents ($P > 0.05$).	44
Figure 25 : Comparaison de la taille des mâles accouplés et non accouplés ainsi que des mâles collectés à différents temps donnés au cours de l'essaimage d' <i>An. coluzzii</i> à VK7 (A) et d' <i>An. gambiae</i> à Soumouso (B).....	46
Figure 26 : Comparaison de la taille des mâles et celle des femelles pris en couples et distribution des fréquences de la taille des mâles accouplés (en rouge) et non accouplés (en bleu) chez <i>An. coluzzii</i> (VK7) (A, B) et <i>An. gambiae</i> (Soumouso) (C, D).....	47
Figure 27 : Corrélation entre les ailes gauches et droites chez les mâles accouplés et non accouplés d' <i>An. coluzzii</i>	48
Figure 28 : Procédure de préparation des diètes.....	55
Figure 29 : Schémas du protocole expérimental	57
Figure 30 : Fréquence de distribution du temps de développement larvaire.....	58
Figure 31 : Temps de développement larvaire par sexe et par type de diète	59

Figure 32 : Impact de la quantité de nourriture et de la densité larvaire sur le temps de développement par type de diète. C1-C4 représentent les 4 concentrations de diètes utilisées dans les tests tandis que D1-D4 se réfèrent aux 4 densités larvaires testées.....	60
Figure 33 : Variation du taux d'émergence en fonction du type de diète	61
Figure 34 : Impact de la quantité de nourriture et du type de diète sur le taux d'émergence en fonction de la densité larvaire. C1-C4 représentent les 4 concentrations de diètes utilisées dans les tests tandis que D1-D4 se réfèrent aux 4 densités larvaires testées.	62
Figure 35 : Impact de la quantité de nourriture et de la densité larvaire sur la taille des ailes en fonction du type de diète. C1-C4 représentent les 4 concentrations de diètes utilisées dans les tests tandis que D1-D4 se réfèrent aux 4 densités larvaires testées.....	63
Figure 36 : Etapes de la technique de traitement des œufs de moustiques élevés en cages 30x30x30cm (A), séchage sur du papier dans un plateau (B), brossage (C) et pesage à l'aide d'une balance de précision (D).....	70
Figure 37 : Différents designs de cages de production de masse expérimentés. Cage 1 (A), Cage 2 (B) et Cage 3 (C).....	75
Figure 38 : Des milliers d'œufs des cages de production de masse recueillis sur du papier filtre	76
Figure 39 : Courbe d'étalonnage entre le poids sec et le nombre d'œufs comptés.....	77
Figure 40 : Courbes de survie (Kaplan-Meier) des mâles (A) et femelles (B) issus d'œufs frais ou secs.	80
Figure 41 : Dynamique de pupaison dans les plateaux de production de masse (hors du système du rack).....	81
Figure 42 : Production journalière d'œufs par cage pour les deux types d'élevage confondus	82
Figure 43 : Irradiateur à rayon gamma (^{60}Co , IPCL, Seibersdorf).....	87
Figure 44 : Grande cage d'environ 1,75 m ² , dans la serre expérimentale ayant servi aux tests de compétitivité sexuelle des moustiques stériles vs non traités.....	89
Figure 45 : Le taux d'éclosion des œufs en fonction des ratios et des contrôles stérile et non traités	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Valeurs moyennes des sucres totaux, du glycogène, des lipides, des protéines contenues dans différents groupes de moustiques en fonction du temps (matin, soir, essaim) et de l'activité.....	43
Tableau II : Masse des diètes à prélever pour un volume de 250 ml.....	55
Tableau III : Impact des différentes variables sur le temps de développement larvaire	59
Tableau IV : Impact des différentes variables sur le taux d'émergence mesuré par une analyse de régression logistique (GLM)	62
Tableau V : Impact des différentes variables sur la taille des ailes	63
Tableau VI : Comparaison entre nombres observés et nombres attendus d'œufs secs issus de l'élevage en petites cages et des cages de production de masse	78
Tableau VII : Comparaison des traits d'histoire de vie des moustiques selon le type d'œufs secs ou frais élevés dans les plateaux de production de masse	79
Tableau VIII : Compétitivité des mâles au bout de deux jours (Taux d'insémination et d'éclosion) en fonction des différents ratios mâles stériles: mâles non traités	90
Tableau IX : Taux d'insémination et d'éclosion en fonction du temps de contact entre les mâles et les femelles.....	92

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour l'identification des spécimens du terrain.....	119
Annexe 2 : Protocole de dosage des métabolites d' <i>An. gambiae s.l.</i> par spectrophotométrie gamme des standards et Préparations des réactifs et solutions	121
Annexe 3 : Articles	124

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN = Acide Desoxyribo-Nucléique

AIEA= Agence Internationale de l'Energie Atomique

al. = Collaborateurs

An. = *Anopheles*

ASB = Albumine du Sérum de Bovin

bp = Paire de base

°C = Degré Celsius

CTAB = Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DNTP = DésoxyriboNucléotideTriPhosphate

DO = Densité Optique

h = heure

IRSS = Institut de Recherche en Sciences de la Santé

IPCL= Laboratoires de contrôle des vecteurs ('Insect Pest Control Laboratories')

km = kilomètre

m = mètre

mg=milligramme

ml = millilitre

mm = millimètre

mn = minute

µl = microlitre

MILDA: Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide de Longue Durée d'Action

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PBS = Phosphate Buffer Salin

PCR = Polymerase Chain Reaction.

PID = Pulvérisations intradomiciliaires

SIT= Sterile Insect Technique

TIS= Technique de l'Insecte Stérile

WHO = World Health Organization

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

1. **Maïga H**, Dabiré RK, Lehmann T, Tripet F and Diabaté A. Variation in Energy Reserves and Role of Body Size in the Mating System of *Anopheles gambiae*. *J Vector Ecol.* 2012; 37(2):289-297
2. **Maïga H**, Niang A, Sawadogo SP, Dabiré RK, Lees RS, Gilles JR, Tripet F, and Diabaté A. Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success. *Acta Trop.* 2014; 132 Suppl: S102-7
3. **Maïga H**, Damiens D, Niang A, Sawadogo SP, Fatherhaman O, Lees RS, Roux O, Dabiré KR, Ouédraogo GA, Tripet F, Diabaté A and Gilles JRL. Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzii* in large cages. *Malar J.* 2014; 13:460
4. Sawadogo PS, Namountougou M, Toé KH, Rouamba J, **Maïga H**, Ouédraogo KR, Baldet T, Gouagna LC, Kengne P, Simard F, Costantini C, Gibson G, Diabaté A, Lees RS, Gilles JR and Dabiré KR. Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop.* 2014; Apr; 132 Suppl: S42-52
5. Yahouédo GA, Djogbéno L, Saïzonou J, Assogba BS, Makoutodé M, Gilles JR, **Maïga H**, Mouline K, Soukou BK, Simard F. Effect of three larval diets on larval development and male sexual performance of *Anopheles gambiae s.s.* *Acta Trop.* 2014; Apr; 132 Suppl: S96-101.

Publications en préparation

6. **Maïga H**, Damiens D, Diabaté A, Dabiré RK, Ouédraogo GA and Gilles JRL. Large-scale *Anopheles arabiensis* egg quantification methods for mass-rearing operations.
7. Epopa NPS, **Maïga H**, Hien FS, Dabiré KR, R Lees, Gilles J, Baldet T, Tripet F, GA Ouédraogo, and Diabaté A. Assessment of the developmental success of *Anopheles coluzzii* larvae under different nutrient regimes: effects of diet quality, food amount and larval density.

Communications

Maïga H, Niang A, Sawadogo SP, Dabiré RK, Lees RS, Gilles JR, Tripet F and Diabaté A. Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success. “*EMBO Conference on Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors: From Basic Vector Biology Research to Disease Control*” Du 15 au 19 Juillet 2013 à Kolymbari, Crète, Grèce. Présentation orale et Poster.

Maïga H, Damiens D, Niang A, Sawadogo SP, Fatherhaman O, Lees RS, Roux O, Dabiré KR, Ouédraogo GA, Tripet F, Diabaté A and Gilles JRL. Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzii* in large cages. *6^e conférence pan-africaine sur le paludisme (MIM Malaria Conference), du 06 au 11 Octobre 2013, Durban, Afrique du Sud.* Poster.

Résumé

L'évolution de la résistance aux insecticides et aux anti-malariques a significativement réduit l'efficacité des outils conventionnels de lutte contre le paludisme de sorte que des méthodes alternatives ou complémentaires de lutte sont désespérément demandées. Dans l'éventualité de l'utilisation de la lutte génétique contre les vecteurs du paludisme, il est essentiel de mener dès à présent des études pour le succès de la méthode. Ainsi, nous avons exploré le comportement de reproduction d'*Anopheles gambiae s.l.* tant sur le terrain qu'en laboratoire afin de déterminer les paramètres essentiels à une compétitivité sexuelle optimale des mâles de moustiques. Nous avons également travaillé à optimiser les méthodes d'élevage des anophèles en laboratoire. Il s'agissait d'évaluer le rôle des réserves nutritionnelles et de la taille des mâles sur le comportement d'essaimage et d'accouplement chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* en conditions naturelles, d'évaluer l'impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d'*An. coluzzii*, de standardiser l'élevage en masse d'*An. arabiensis* au laboratoire et de tester la compétitivité sexuelle des mâles d'*An. coluzzii* stériles en grandes cages de laboratoire. Notre étude a montré que l'essaimage des mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* consomme 50% des réserves de sucres et de glycogène après 25 min d'essaimage. Cependant, les réserves étaient similaires chez les mâles accouplés et non accouplés. Les mâles accouplés chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* collectés dans deux sites différents, étaient en moyenne significativement plus grands que les mâles non accouplés mais tous étaient symétriques. Toutefois, la taille de ces mâles accouplés se situait autour d'une valeur centrale intermédiaire. L'évaluation de l'impact du régime alimentaire des larves a montré que chez *An. coluzzii*, la qualité et la quantité de la nourriture tendent à optimiser les paramètres de développement des larves à savoir à augmenter le taux d'émergence, à diminuer le temps de développement et à augmenter la taille des adultes à l'émergence. Par contre, une augmentation de la densité larvaire tend à produire un effet inverse sauf si elle est associée à une augmentation concomitante de la quantité de nourriture disponible dans le milieu. Des 4 régimes testés, le régime 2 (poudre de thon, poudre de foie de bovin, levure, vitamines) assurait un développement optimal des moustiques. La standardisation de la production de masse d'*An. arabiensis* a permis de développer une méthode rapide et efficace de collecte et la quantification d'œufs séchés sans affecter ni leur qualité ni la qualité des adultes qui en ont résulté. Cette méthode a permis une distribution uniforme des œufs dans les plateaux du rack de production de masse de larves et pupes ayant abouti à un rendement de productivité pré-imaginale de 50%. Les mâles d'*An. coluzzii* stériles étaient à moitié aussi compétitifs que les mâles non traités pendant une ou deux nuits dans les grandes cages, en serre expérimentale. Lorsque le ratio de mâles stériles : mâles non traités en compétition pour des femelles et la durée du contact entre mâles et femelles étaient plus élevés, le taux d'insémination des femelles augmentait significativement.

Cette étude a contribué à une meilleure connaissance de certains aspects clés liés au succès reproducteur et à l'élevage des moustiques et nécessaires pour optimiser l'élevage en masse au laboratoire et le lâcher de mâles ayant une compétitivité sexuelle supérieure. C'est une importante étape vers le développement d'une chaîne de production de masse en vue de l'application de la lutte génétique contre les vecteurs du paludisme basée sur les lâchers massifs de mâles stériles ou génétiquement modifiés.

Mots-clés: Paludisme, *An. gambiae s.l.*, Mâles, Taille, Réserves énergétiques, Alimentation larvaire, Elevage de masse, mâles stériles, Compétitivité sexuelle, Lutte génétique.

Abstract

The effectiveness of the conventional tools to fight against malaria is significantly reduced by the evolution of vectors resistance to insecticides and parasites to drugs and today development of alternative methods are highly needed. Investigating on field and lab mosquitoes traits that could further impact the success of alternative or innovative tools to fight against malaria vectors such as genetic control strategies based on the release of high mosquitoes numbers, is important. We therefore explored the *Anopheles gambiae s.l.* mating behavior on field and in the laboratory in order to find traits that were essential for male mosquitoes sexual competitiveness and also improved their rearing system. Thus, we explored the role of nutritional reserves and body size in *An. gambiae s.l.* males mating success and assessed the developmental success of *An. coluzzii* larvae under different nutrient regimes. We also developed a large-scale for *An. arabiensis* eggs quantification methods for mass-rearing operations and tested the effects of sterilization on sexual competitiveness of *An. coluzzii* in large cages. Our results showed that glycogen and sugar reserves are mobilized for swarming and mating activities and the energetic cost of 25 min of swarming was around 50% of the male's sugar and glycogen reserves. However, no difference in carbohydrate content was observed between mated and unmated males. Mated males were on average bigger than unmated ones but both were symmetrical. The distribution of wing size of mated males was focused around a central value, suggesting that intermediate size of males is advantageous in the *An. coluzzii* and *An. gambiae* mating system. The developmental success of *An. coluzzii* larvae under different nutrient regimes showed the emergence success rate and mosquito body size increased with food availability, but decreased with increasing larval density. Conversely pre-imaginal developmental time was shortened with increasing food availability but augmented with increasing larval density. Of the 4 diets tested, the diet 2 (Tuna Meal Powder, Bovin Liver Powder, Yeast, Vitamin mix) yielded the best results as it produced a good balance between the emergence success rate, the pre-imaginal developmental time and the adult body size. An efficient and fast method of collection and dried egg number estimation without impairing the quality of the eggs and the resulted adults has been developed. With the method developed here, it could be easier to fill with the same amount of eggs each of the fifty rearing trays held in the rack developed leading to around 50% pupae production per rack. We showed that the sterile males were half as competitive as the untreated males when allowed to mate over one or two nights in large cages. When males and females consort for two days with different ratios, a significant difference in insemination rate was observed between ratio treatments. Number of days of exposure to mates significantly increased the insemination rate, as did the increased number of males present in the untreated: sterile male ratio treatments.

This study contributed to a better understanding of certain key aspects related to the mosquitoes mating and rearing success in order to produce males with high sexual performance reared in optimized laboratory conditions. It is an important step in the development of mass-rearing facility for the development of genetic control tools in order to release high numbers of sterile or genetically modified male mosquitoes against malaria vectors.

Key words: Malaria, *An. gambiae s.l.*, Males, Body size, Nutritional reserves, Larval diets, Mass-rearing, Sterile males, Sexual competitiveness, Genetic control tools.

INTRODUCTION GENERALE

Contexte, problématique, objectifs

Les fièvres intermittentes découvertes par Hippocrate au V^e siècle avant Jésus Christ, attribuées à des maladies liées à l'environnement (la *mal aria*, le mauvais air) ont été plus tard reliées au paludisme après la découverte des parasites responsables chez l'homme par Laveran en Constantine en 1880 (Mouchet *et al.* 2004).

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire hématophage du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle infecté du genre *Anopheles*. Cinq espèces de *Plasmodium* sont à l'origine du paludisme chez l'homme: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria* et *P. knowlesi*. Parmi ces espèces, *Plasmodium falciparum* est responsable de la forme la plus sévère de la maladie et de la plupart des décès dus au paludisme (OMS, 2010). Cette maladie infectieuse cause plus de 600 000 cas de décès chaque année, dont plus de la moitié (77%) concernait les enfants africains de moins de cinq ans, en 2012 (OMS, 2013). Les femmes enceintes constituent aussi un autre groupe à risque. A ce lourd tribut humain, s'ajoute l'impact socio-économique considérable dû aux dépenses afférentes aux traitements des malades, au manque à gagner dans la productivité et à la prévention de la maladie dans les zones les plus touchées. Par exemple la prise en charge des malades et des décès associés au paludisme coûtent à la seule économie africaine environ 12 milliards de dollars par an (RBM, 2014), ce qui démontre bien le lien entre la pauvreté et le paludisme en Afrique (Sachs et Malaney, 2002).

Dès que le rôle joué par les anophèles dans la transmission du paludisme a été mis en évidence par Ross en 1887, la lutte antivectorielle a vu le jour. D'autres découvertes ont suivi notamment celle des insecticides de synthèse et de la mise au point de nouveaux médicaments à tel point que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) adopta en 1954 un plan pour l'éradication du paludisme aux Amériques (OMS, 1957). Cette idée d'éradication fut progressivement abandonnée face aux développements de résistances des vecteurs aux insecticides et des parasites aux médicaments (Mouchet *et al.* 2004). L'histoire lointaine de l'échec de l'éradication du paludisme dans les années 1955 par l'utilisation mitigée du DDT et des antipaludiques sonne aujourd'hui comme un appel à garder en mémoire que la maladie reste enracinée et nécessite beaucoup plus d'efforts pour l'atteinte de cet objectif ultime. De plus, une résistance aux pyréthrinoïdes, la seule classe d'insecticides utilisée actuellement pour imprégner les moustiquaires (Zaim *et al.* 2000) et couramment utilisée en pulvérisations intra-domiciliaires, a été observée ces dernières années dans 27 pays d'Afrique et 41 pays dans le monde (Chandre *et al.* 1999; Diabaté *et al.* 2002; N'Guessan *et al.* 2003; Tripet *et al.*

2007; Dabiré *et al.* 2007). Il faut noter par ailleurs le changement dans le comportement de piqûres de certaines espèces vectrices du paludisme suite au déploiement massif des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action (MILDA). En effet, une partie des vecteurs majeurs du paludisme incluant *An. gambiae s.s.*, *An. funestus* et *An. arabiensis* piquent désormais plus tôt le soir avant que les gens n'aillent au lit ou très tôt le matin (Pates et Curtis, 2005; Moiroux *et al.* 2012; 2014). Certaines espèces ont même développé une résistance comportementale leur permettant d'éviter d'entrer en contact ou de limiter la durée de ce contact avec l'insecticide (Namountougou *et al.* 2012). Ces différents mécanismes de résistance développés par les moustiques mettent à mal la stratégie globale de contrôle des vecteurs du paludisme essentiellement basée sur l'utilisation des MILDA et la Pulvérisation Intra-Domiciliaire (PID).

Adoptée depuis 1978, la stratégie de contrôle du paludisme met l'accent sur la lutte antivectorielle, mais également sur l'endiguement des épidémies, le renforcement des capacités nationales, le diagnostic et le traitement rapide des cas. Cette stratégie envisage aussi le développement de vaccins pour endiguer le mal à la racine.

Cependant, malgré d'énormes efforts réalisés ces dernières années, notamment avec le développement des combinaisons thérapeutiques à base d'arthémisinine (ACT) et la couverture universelle des moustiquaires imprégnées d'insecticides, le paludisme reste encore un sérieux problème de santé publique en Afrique sub-saharienne. Le Burkina Faso se situe dans cette zone endémique où le paludisme demeure la première cause de consultation hospitalière avec 7,15 millions de cas enregistrés dont 7 600 décès rapportés en 2013 (Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP)). Les consultations dues au paludisme des enfants de moins de cinq ans représentaient 61,4% en 2011, 77,7% des hospitalisations et ont malheureusement causé 80% des cas de décès (Annuaire Statistique 2011). Il n'existe aucun vaccin fiable à nos jours. Seuls quelques-uns sont en phase d'expérimentation. C'est le cas du vaccin RTS'S pour lequel le Burkina Faso fait partie des pays participant à l'essai vaccinal (Alonso *et al.* 2011; Tinto *et al.* 2014).

Face à ce phénomène généralisé de résistance et de changement comportemental des vecteurs, il s'avère nécessaire de repenser la stratégie de lutte en l'orientant vers le développement de nouvelles stratégies afin de s'affranchir de l'utilisation d'insecticides (Benedict et Robinson, 2003; Fontenille et Simard, 2004; Helinski *et al.* 2006; Catterucia 2009; Klassen 2009; Diabaté *et al.* 2013) et de réduire significativement la mortalité attribuable au paludisme. Au nombre de méthodes innovantes et/ou complémentaires de lutte

antivectorielle figurent la lutte génétique basée sur l'utilisation des moustiques réfractaires au développement du *Plasmodium* (Ito *et al.* 2002), des bactéries commensales du moustique, *Wolbachia* (Baldini *et al.* 2014), des champignons transgéniques (Kamareddine, 2012), de moustiques génétiquement modifiés (Alphey *et al.* 2002), ou le lâcher de mâles stériles qu'ils soient obtenus conventionnellement (stérilisation chimique ou par irradiation) ou par modifications génétiques (Benedict et Robinson, 2003; Fontenille et Simard, 2004; Catteruccia *et al.* 2009; Klassen, 2009).

La Technique de l'Insecte Stérile (TIS) inventée par Kipling en 1937 vise à contrôler une population d'insectes en altérant leur fertilité. La TIS classique a été utilisée avec succès contre divers insectes nuisibles tels que la lucilie bouchère (Lindquist *et al.* 1993), la mouche méditerranéenne des fruits (Dyck *et al.* 2005) et la mouche tsétsé au Zanzibar (Vreysen *et al.* 2000). Le lâcher expérimental au Salvador d'*An. albimanus* chimio stérilisés a réduit significativement la transmission du paludisme suite à la réduction de la population sauvage de cette espèce (Dame *et al.* 1974).

Toutefois, les approches génétiques appliquées en santé publique depuis les années 1960 ont eu un succès très limité. Des programmes d'utilisation de la TIS réalisés aux Etats Unis chez *An. quadrimaculatus* en 1959-1960 et *Aedes aegypti* entre 1960 et 1961 (Weidhaas *et al.* 1962), n'ont pas eu d'effet sur les populations sauvages. De même, le lâcher de mâles stériles (après chimio stérilisation) d'*An. culicifacies* au Pakistan n'a pas produit l'effet escompté dû à une faible compétitivité sexuelle des mâles (Reisen *et al.* 1981). Le lâcher de mâles d'*An. gambiae* stériles (obtenus après croisement entre *An. gambiae s.s.* et *An. melas*) à Pala (Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) n'a eu aucun impact sur la densité des femelles d'*An. gambiae*, malgré la bonne dispersion des mâles relâchés (Davidson *et al.* 1970). L'arrêt définitif de ces programmes a été attribué à une faible compétitivité sexuelle (succès reproductif) des mâles. Il a été noté par ailleurs que d'autres facteurs seraient responsables de l'inefficacité des moustiques élevés au laboratoire. Par exemple, outre le rythme circadien qui joue un rôle capital dans le comportement de reproduction des mâles d'anophèles, leur statut nutritionnel peut être déterminant dans la longévité, dans le comportement d'essaimage, de dispersion spatiale voire le succès dans l'insémination des femelles sur le terrain (Briegel, 1990; Manda *et al.* 2007). La compétitivité des mâles élevés au laboratoire, stérilisés et relâchés sur le terrain est aussi non seulement intimement liée au processus d'élevage (alimentation/densité larvaire, infrastructures d'élevage de masse, température, humidité relative, luminosité, séparation larves-pupes, etc.) mais aussi à la méthode de stérilisation (Helinski *et al.* 2009).

Dans l'éventualité de plus en plus probable d'utilisation de vastes programmes de lutte contre les vecteurs du paludisme basés sur **la lutte génétique**, il est essentiel de mener dès à présent des études de **terrain** et de **laboratoire** sur les pré-requis indispensables au **succès de la méthode**. C'est dans cette optique que s'inscrit la présente étude qui a pour but d'explorer le **comportement de reproduction** d'*An. gambiae s.l.* tant sur le terrain qu'en laboratoire afin de déterminer tous les paramètres essentiels à **une compétitivité sexuelle** optimale des **mâles** de moustiques et d'**optimiser les méthodes d'élevage** des anophèles en laboratoire.

Il s'agissait plus spécifiquement :

- d'évaluer le rôle des réserves nutritionnelles et de la taille des mâles sur le comportement d'essaimage et d'accouplement chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* en conditions naturelles;

- d'évaluer l'impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d'*An. coluzzii*;

- de standardiser l'élevage en masse d'anophèles au laboratoire: du traitement des œufs à l'obtention des adultes;

- de tester la compétitivité sexuelle des mâles de moustiques stériles en condition contrôlée (grandes cages), en serre expérimentale.

Les travaux de cette thèse s'articulent autour de trois axes majeurs incluant i) la **biologie de reproduction** du **mâle** en milieu naturel, ii) l'amélioration des **techniques d'élevage** à petite (*An. coluzzii*) et à grande échelle (*An. arabiensis*) au laboratoire et iii) la **compétitivité sexuelle** des mâles stériles irradiés.

La présentation du travail se fera selon le format suivant :

- Un premier chapitre « **Revue Bibliographique** » présentant l'état des connaissances sur la bio-écologie des vecteurs du paludisme et le concept de la lutte génétique dans la lutte antivectorielle.

- Un deuxième chapitre « **Méthodologie générale** » résumant les matériels et méthodes utilisés;

- Un troisième chapitre « **Résultats et Discussions** » subdivisé en quatre sections dénommées « **Parties** » brièvement décrites ci-dessous. Chaque « **Partie** » représente un article publié, soumis ou en cours de préparation. Les **Parties** sont structurées en introduction, méthodologie utilisée, résultats, discussion et conclusion partielle;

- **Une conclusion générale et des perspectives** constituent la dernière partie.

La **Partie 1**, « **Rôle des réserves nutritionnelles et de la taille des mâles sur le comportement d’essaimage et d’accouplement chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* en condition naturelle** », porte sur les facteurs écologiques et physiologiques liés au comportement reproducteur des mâles avec évaluation de la dépense énergétique allouée aux activités essentielles telles que l’essaimage et l’accouplement.

La **Partie 2**, « **Evaluation de l’impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d’*An. coluzzii*** », a testé différentes formulations de diètes larvaires (régimes alimentaires) afin de dégager celle qui permet d’obtenir des mâles de bonne qualité, répondant aux critères de sélection rencontrés en milieu naturel.

La **Partie 3**, « **Standardisation de l’élevage en masse d’anophèles au laboratoire (du traitement des œufs à l’obtention des adultes)** », propose un système d’élevage en masse d’*An. arabiensis* au laboratoire sans pour autant altérer la survie et la performance sexuelle des mâles. Cette méthode, visant à optimiser le coût de production et la qualité des adultes produits par milliers, passe par le développement d’une méthode standard de quantification des œufs d’anophèles.

Enfin la **Partie 4**, « **Compétitivité sexuelle des mâles de moustiques stériles en condition contrôlée, grandes cages de laboratoire** », évalue les conséquences de l’irradiation des mâles sur leur niveau de compétitivité sexuelle en utilisant des indicateurs tels que le taux d’accouplement et la stérilité induite aux femelles par des mâles élevés au laboratoire.

Ce travail apportera des connaissances sur la bio-écologie des mâles d’*An. gambiae s.l.* et sur l’optimisation des méthodes d’élevage à même de contribuer au développement de méthodes alternatives innovantes et complémentaires de lutte contre les vecteurs du paludisme.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le complexe *Anopheles gambiae s.l.*

Le complexe *An. gambiae s.l.* a longtemps été considéré comme un groupe de cinq espèces jumelles morphologiquement identiques incluant *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis*. *An. gambiae s.s.*, un des membres de ce complexe, fut successivement subdivisé en 5 formes chromosomiques sur la base d'inversions sur le bras du chromosome 2R (Bamako, Bissau, Forest, Mopti et Savanna) (Coluzzi *et al.* 1985; Touré *et al.* 1998) puis en deux formes moléculaires M et S (Della Torre *et al.* 2001) grâce à une PCR diagnostique de l'ADN ribosomal sur le chromosome X. Les formes moléculaires ont été récemment élevées au rang d'espèces, *An. coluzzii* (forme moléculaire M) et *An. gambiae* (forme moléculaire S) (Coetzee *et al.* 2013).

Le complexe *An. gambiae* est donc composé maintenant de 8 espèces :

- *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson sp.n (Coetzee *et al.* 2013)
- *An. gambiae* Gilles (Coetzee *et al.* 2013)
- *An. arabiensis* Patton, 1904.
- *An. bwambae* White, 1985.
- *An. quadriannulatus* A. Theobald, 1911 (*An. quadriannulatus* **forme A**, Afrique du Sud).
- *An. amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee sp.n (*An. quadriannulatus* **forme B** Ethiopie)
(Coetzee *et al.* 2013)
- *An. melas* Theobald, 1903
- *An. merus* Dönitz, 1902

1.2. Bio-écologie des anophèles

1.2.1. Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle biologique comprend deux phases (Figure 1) : Une phase aquatique pour les stades immatures (pré imaginaux) à savoir l'œuf, les larves et la nymphe et une phase aérienne correspondant à la vie des moustiques adultes ou imago, avec des mâles et des femelles.

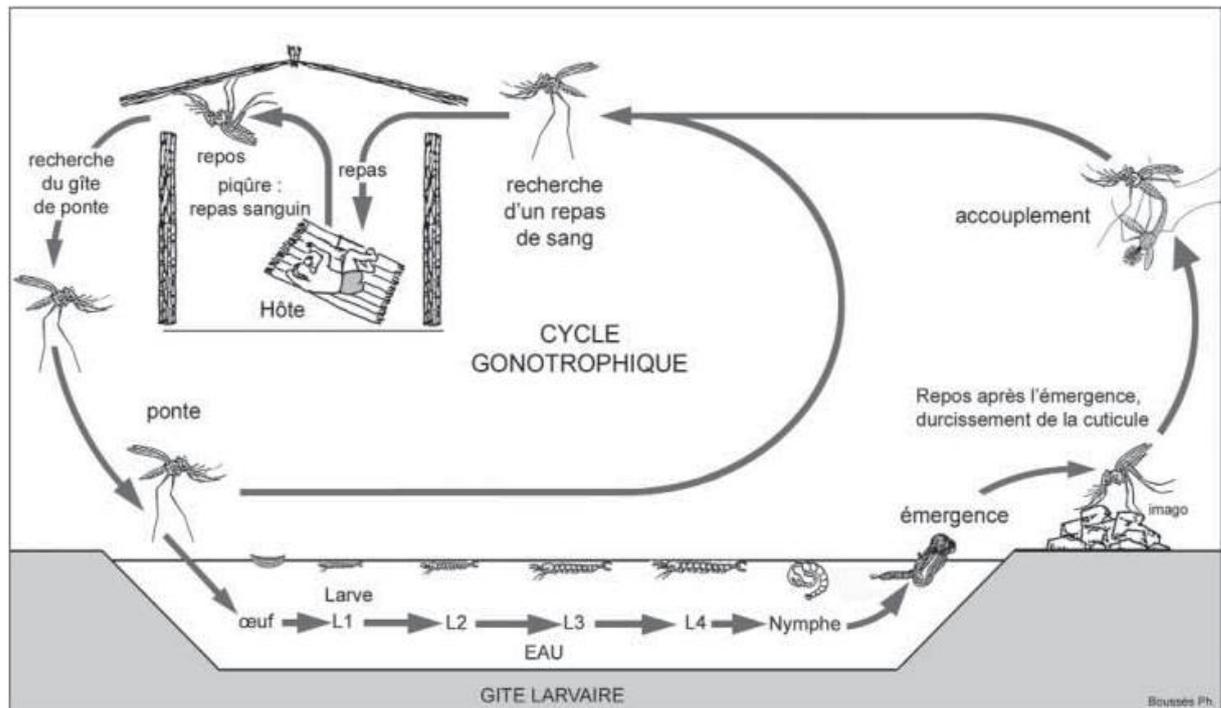


Figure 1 : Cycle biologique de l'anophèle (Boussès Ph.)

a. Les œufs

Une femelle d'anophèle pond entre 50 et 200 œufs. Les œufs présentent une forme ovulaire de 0,5 mm de long de couleur blanchâtre au moment de la ponte. L'œuf est muni de trois enveloppes, la première (interne) entoure le vitellus et l'embryon, la deuxième est l'endochorion qui va durcir et se mélaniser peu après la ponte (2 heures) et la troisième (externe) est l'exochorion. L'œuf est aussi muni de deux flotteurs latéraux permettant de rester à la surface de l'eau. Les œufs d'anophèles ne résistent généralement pas à la dessiccation et éclosent dans les 48 heures après l'oviposition, dès que l'embryon est entièrement développé (Clements, 1992).

b. Les larves

Il existe quatre stades larvaires (L1, L2, L3, L4) séparés chacun par une mue correspondant à une période de croissance avec une augmentation perceptible de taille (Figure 1). Morphologiquement la larve est constituée de trois parties, la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 2). La larve s'alimente en filtrant les particules alimentaires à la surface de l'eau. La croissance larvaire est tributaire de la température de l'eau, de la densité de larves, de la quantité et de la qualité de nourriture disponible (Gilles *et al.* 2011).

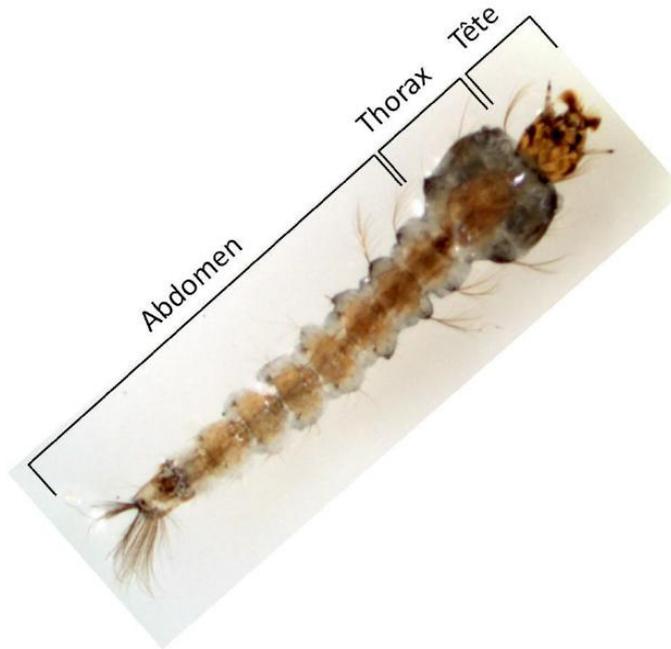


Figure 2 : Anatomie de la larve d'anophèles (*Manuel formation, RTI International*)

c. La nymphe ou puppe

La nymphe représente le dernier stade de la vie pré-imaginale et de la phase aquatique. A la fin de la vie larvaire, la cuticule de la nymphe se fend longitudinalement pour donner une nymphe. Celle-ci ne s'alimente pas et subit des remaniements internes très importants au cours de la métamorphose qui permet la transformation en adulte ailé. C'est au cours de la vie nymphale que commence la spermatogenèse (Clements, 1992; Helinski *et al.* 2009). Il existe un dimorphisme clairement défini (forme du génitalia de la femelle (plus court) et du mâle (plus allongé)) au stade nymphal permettant la différenciation entre mâles et femelles (Figure 3). Ce critère est mis à profit pour le sexage des pupes sous microscope au laboratoire.



Figure 3 : Pupae femelle (gauche) et mâle (droite) *An. gambiae*. Les cercles indiquent la différence au niveau du génitalia de la femelle (plus court) et du mâle (plus allongé) (Photo M. Fraiture)

d. Les adultes

Après l'émergence, l'imago est composé de trois parties bien distinctes: la tête qui porte les pièces buccales, les yeux, les antennes et les palpes (qui permettent de déterminer facilement le sexe); le thorax qui porte 3 paires de pattes et 2 paires d'ailes; et l'abdomen dont l'extrémité permet aussi de différencier mâles et femelles (Figure 4).



Figure 4 : Femelle (gauche) et mâle (droite) adultes *An. gambiae* (Photo M. Fraiture)

1.2.2. Le comportement trophique et de reproduction des anophèles

La biologie de l'adulte est caractérisée par l'alimentation et la reproduction qui, chez la femelle, s'accompagnent de la dispersion à la recherche successive d'un premier repas sucré afin d'assurer l'apport énergétique nécessaire au vol pour rejoindre les sites d'essaimage, effectuer l'accouplement et rechercher un hôte vertébré pour y prendre un repas sanguin qui permettra la maturation des œufs (Clements, 1992).

La recherche du repas de sang peut se faire soit sur un hôte humain (anthropophilie) ou animal (zoophilie) à l'intérieur (endophagie) ou à l'extérieur (exophagie) des habitations. Après ce repas, s'ensuit la digestion et la maturation des œufs pendant 2 à 3 jours dans les sites de repos soit à l'intérieur (endophilie) ou à l'extérieur (exophilie) des habitations. La femelle gravide (portant des œufs) recherche des gîtes pour déposer ses œufs (Figure 5). C'est lors de ces repas de sang que la femelle s'infecte en se gorgeant sur un hôte malade et transmet le parasite. Ces comportements permettent par ailleurs d'orienter le choix des stratégies de la lutte contre les femelles.

La femelle d'*An. gambiae* est inséminée généralement par un seul mâle mais des études ont révélé la possibilité de rares cas d'inséminations multiples (Tripet *et al.* 2003). Lors de l'insémination, le mâle secrète une masse collante (plaque d'insémination) pour boucher l'appareil génital de la femelle qui prévient ainsi toute autre insémination et qui déclenche l'oviposition (Rogers *et al.* 2009; Gabrieli *et al.* 2014). Les spermatozoïdes sont alors stockés dans une poche appelée spermathèque et y seront conservés jusqu'à la fécondation des œufs lors de l'oviposition (Detinova, 1962).

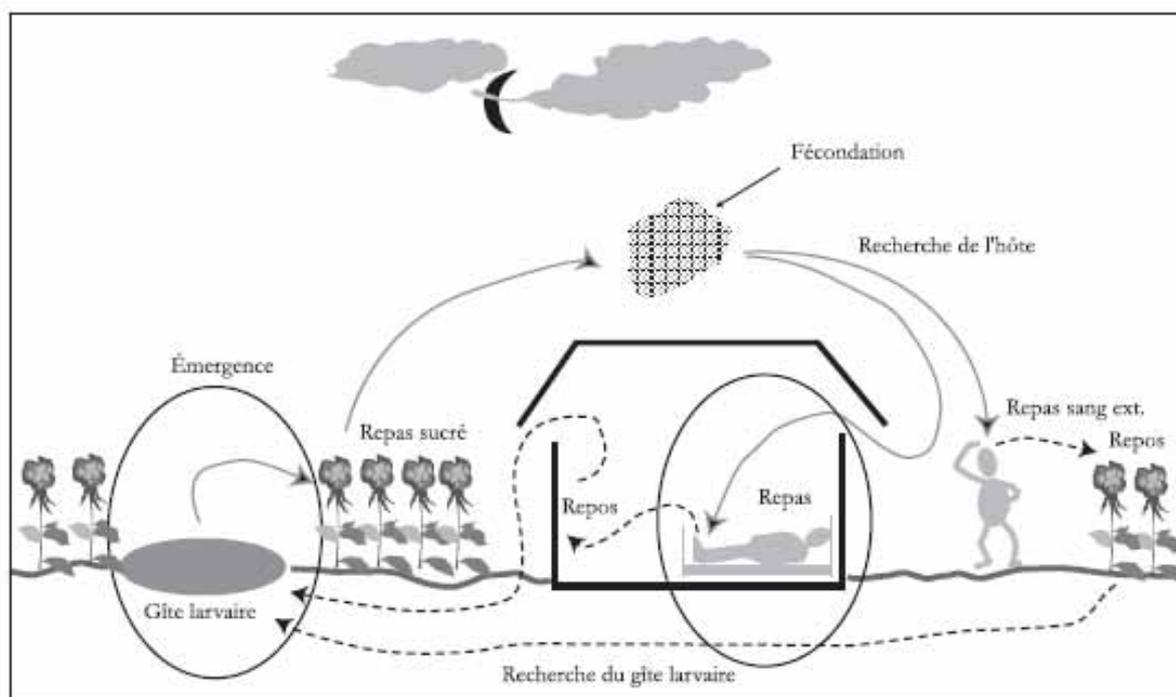


Figure 5 : Les phases du cycle biologique des femelles d’anophèles, d’après *International Water Management Institute*

Dans leur environnement, les mâles se nourrissent exclusivement de sucre végétal (nectar, miellat et autres exsudats végétaux) qui leur fournit l’énergie nécessaire pour leurs activités (Foster, 1995; Müller et Schlein, 2005; Gary *et al.* 2009). Les moustiques adultes obtiennent donc leurs éléments hydrocarbonés essentiellement à partir du nectar floral mais aussi des protéines des fruits en décomposition. Ces substrats sont cependant pauvres en lipides, métabolites nécessaires à la production de phéromones chez le mâle (Warburg et Yuval, 1996). Le comportement de reproduction (Figure 6C) est essentiellement basé sur la formation d’essaims qui constituent le lieu d’accouplement des anophèles (Charlwood et Jones, 1979; Charlwood *et al.* 2002; Diabaté *et al.* 2003; 2006; 2009; 2011). L’essaim est une agrégation de mâles qui se forme au crépuscule et qui dure environ 30 minutes (Charlwood et Jones, 1979; Yuval *et al.* 1993; 1994; Charlwood *et al.* 2002). Peu avant l’heure d’essaimage les antennes des mâles s’activent puis s’ensuit l’envol vers les sites d’essaimage. Initié par un premier mâle, la densité de l’essaim augmente graduellement jusqu’au pic puis décline vers la fin de l’essaimage (Diabaté *et al.* 2009). Cela définit trois temps bien distincts (début, pic et fin) de l’essaim qui peuvent être déterminés par plusieurs facteurs (climat, prédateurs) (Yuval *et al.* 1993; Charlwood *et al.* 2002; Sawadogo *et al.* 2014). Ces facteurs déterminent aussi l’allocation individuelle d’énergie des mâles du fait de la dynamique de l’essaim pendant toute la durée de l’essaimage (Yuval *et al.* 1994; Dao *et al.* 2010). Le stock d’énergie est vite

renouvelé par la recherche de nectar floral, juste après l'essaimage (Gouagna *et al.* 2010) et avant la recherche du site de repos.

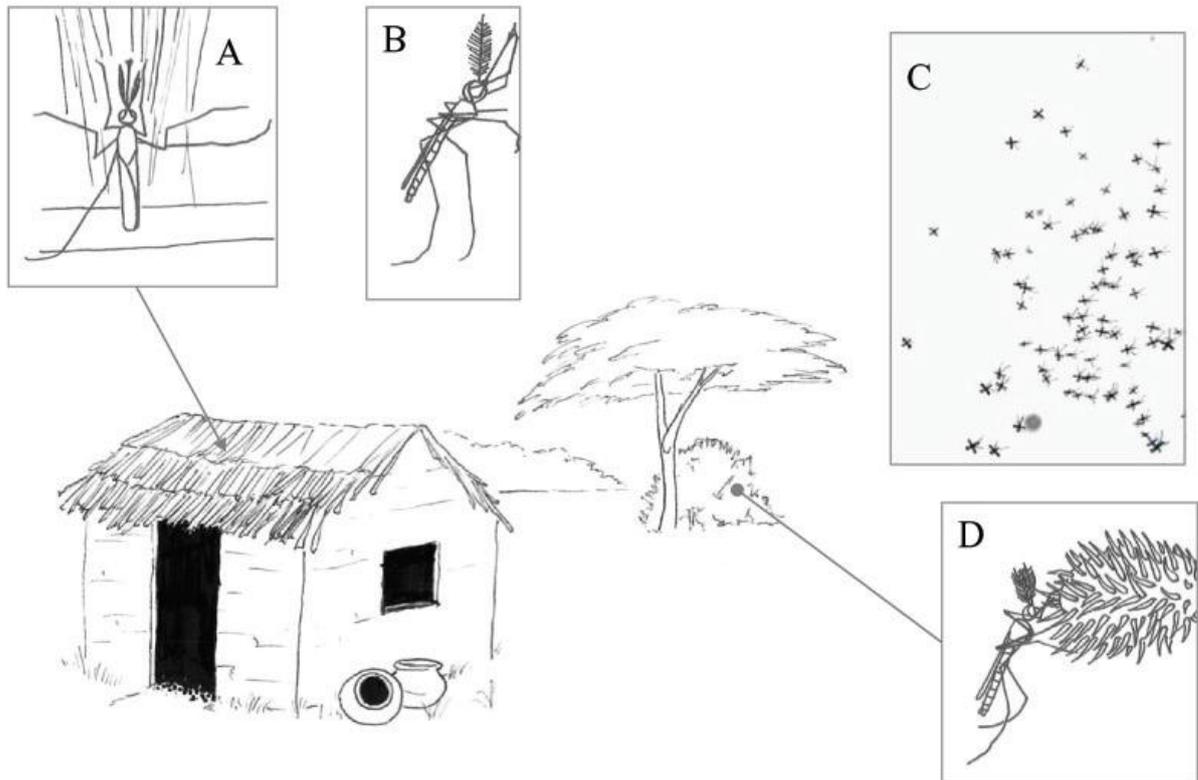


Figure 6 : Les phases du cycle biologique des mâles sexuellement matures d'anophèles : A : Repos diurne à l'intérieur, B : Activation des antennes 1 heure avant l'essaimage, C : départ pour les sites d'essaimage, D : Repas sucré après l'essaimage avant le site de repos à l'intérieur des maisons. (Howell et Knols, 2009)

1.3. La lutte contre le paludisme

Aujourd'hui, les grands programmes de lutte contre le paludisme sont axés sur une stratégie de lutte intégrée basée sur la prise en charge précoce des cas, la chimioprophylaxie ciblée (aux nourrissons, aux femmes enceintes et aux migrants) et la lutte antivectorielle. Cependant face à l'accroissement de la résistance des parasites aux antipaludiques, la lutte antivectorielle est la seule méthode de prévention de masse envisageable en zone d'endémie. En outre, l'OMS a remis dans l'actualité des stratégies de chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS) qui consiste en une administration intermittente de protocoles thérapeutiques complets d'antipaludiques aux enfants pendant la saison du paludisme dans des zones où la transmission a un caractère fortement saisonnier.

1.3.1. La lutte antivectorielle actuelle

Elle vise à réduire le contact hôte-vecteur, les densités ou la longévité des vecteurs. La mise en place effective et efficace de la lutte antivectorielle (Beier *et al.* 2008) dépend de la bio-écologie de l'espèce et du contexte épidémiologique (saisonnalité) de la transmission. Les différentes classes d'insecticides utilisées sont les Organochlorés (DDT, lindane, cyclodiènes), les Organophosphorés (parathion, malhation), les Carbamates, les Pyréthriinoïdes (deltaméthrine, lamda-cyhalothrine, perméthrine), les Régulateurs de croissance (méthoprène, pyriproxyfen) et les toxines bactériennes (*Bacillus thuringiensis israelensis* (B.t.i) et *Bacillus sphaericus*). Ces molécules sont utilisées pour la lutte larvaire mais surtout pour la lutte adulticide.

a. La lutte anti larvaire

La lutte anti larvaire (Killeen *et al.* 2002) vise à réduire les populations pré imaginales d'anophèles. Certains prédateurs comme les poissons et les larves prédatrices des «moustiques éléphants» (Toxorynchites) sont aussi utilisés en plus des larvicides. Cependant, la grande difficulté de cette méthode réside dans le fait qu'elle nécessite un traitement à grande échelle qui couvrirait la totalité des gîtes larvaires. Pourtant, la nature diversifiée et multiple des gîtes d'anophèles rend cette initiative difficilement envisageable. Seuls dans certains contextes singuliers comme les marécages, les rizières et les milieux à nombre de gîtes limités et facilement repérables (milieu urbain, milieu insulaire, oasis), l'utilisation de larvicides biodégradables pourrait être envisagée.

b. La lutte adulticide

Pour réduire les populations de vecteurs, l'utilisation d'insecticides via les PID et les MILDA, est la méthode la plus utilisée. Les PID servent à traiter l'intérieur des maisons à l'aide d'insecticides rémanents. Certaines applications de peintures insecticides combinées à des régulateurs de croissance (pyriproxyfen) sont aussi en cours d'évaluation sur les murs intérieurs des habitations (Mosqueira *et al.* 2010; Dabiré, communication personnelle). La politique de distribution universelle de MILDA a permis de réduire l'incidence du paludisme dans plusieurs pays (Mendis *et al.* 2009). Malheureusement avec l'apparition de la résistance aux insecticides utilisés dans l'imprégnation des moustiquaires (Ranson *et al.* 2009; Dabiré *et al.* 2012; Namountougou *et al.* 2012), nous assistons à un regain d'intérêt pour d'autres méthodes innovantes et/ou complémentaires de lutte contre le paludisme.

1.3.2. Autres méthodes de lutte

D'autres moyens de luttés alternatives et/ou complémentaires incluant l'utilisation des champignons, des bactéries et la stérilité induite sont en pleine expansion dans la lutte contre le paludisme. Des tests réalisés au laboratoire sur l'utilisation des bactéries entomopathogènes pour réduire les populations anophéliennes ont abouti à des résultats prometteurs (Blanford *et al.* 2005). Des récents résultats de recherche des bactéries commensales *Wolbachia* chez *An. gambiae s.l.* en milieu sauvage au Burkina Faso ont aussi été publiés (Baldini *et al.* 2014). Cette bactérie est capable d'induire une incapacité cytoplasmique pouvant être potentiellement utilisée en lutte génétique.

La lutte génétique a été utilisée de par le passé sur une variété d'insectes notamment en agriculture avec un réel succès et il y a aujourd'hui un regain d'intérêt de réutiliser cette méthode contre les vecteurs du paludisme dans des zones climatiques et écologiques isolées (Dame et Curtis, 1996). La lutte génétique revêt plusieurs méthodes. Il y a la TIS qui consiste à stériliser les mâles de moustiques à partir de rayonnements ionisants (Rayons gamma ou X), de produits chimiques (chimio stérilisation) et des translocations ou réarrangements chromosomiques (Knipling *et al.* 1968). L'utilisation des moustiques génétiquement modifiés est une autre méthode génétique qui pourrait être utilisée pour lâcher des insectes à gènes létaux dominants (RIDL[®], 'Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene') (Alphey *et al.* 2002). D'autres approches reposent sur le remplacement des populations anophéliennes par des moustiques transgéniques réfractaires à l'infection aux parasites (Catteruccia *et al.* 2000).

1.3.3. Concept de la lutte génétique

a. Principe

L'ultime but de la lutte génétique est la suppression ou le remplacement de la population initiale. Cette lutte est basée sur la TIS (lâchers de mâles stériles) ou sur l'introduction d'un facteur héréditaire afin de réduire et ou d'empêcher la population cible de se reproduire (utilisation des moustiques génétiquement modifiés). Dans le cas spécifique du remplacement de population, le facteur héréditaire se répandrait très rapidement au sein de la dite population jusqu'au point de fixation. Le mâle est le vecteur de dissémination de ce facteur héréditaire. Pour ce faire, le facteur est préalablement introduit au sein de la population de moustiques produits en masse au laboratoire puis relâchés sur le site d'intervention (terrain) afin de

féconder les femelles sauvages. Ainsi, si les mâles relâchés sont plus compétitifs que les mâles sauvages dans le transfert du gène d'intérêt, il en résultera une extinction de l'espèce cible dans la population sauvage (Robinson, 2002). Par exemple, si le nombre de mâles stériles lâchés qui s'accouplent est 9 fois plus élevé que celui de leurs congénères sauvages, 9 femelles sur 10 n'auront pas de descendance. Au bout de peu de générations, l'apport de mâles stériles continuant, la population cible est anéantie. Cela se traduit par le non renouvellement de l'espèce ciblée du fait de la ponte d'œufs incapables d'éclore.

b. Etapes

Malgré la diversité des approches de la lutte génétique, certains préalables sont indispensables et communs à toutes ces méthodes:

(i) la colonisation de l'espèce cible au laboratoire et sa production en masse sont des points importants dans le dispositif de la lutte génétique. Cela nécessite une bonne connaissance de l'espèce cible à savoir son comportement trophique et reproductif. La production de masse nécessite aussi l'utilisation d'une nourriture à prix abordable sur le marché et qui permet le développement larvaire rapide et l'obtention de mâles de moustiques de qualité supérieure. Du fait du grand nombre de moustiques à produire, il est important de développer des équipements performants de production standardisée de masse.

(ii) La compétitivité sexuelle des mâles à relâcher: la souche de moustiques maintenue en captivité doit être sexuellement compétitive afin d'assurer l'accouplement et la stérilisation des femelles (TIS) ou le transfert du gène d'intérêt au sein de la population sauvage (utilisation des moustiques génétiquement modifiés). Il est aussi important que le processus de colonisation au laboratoire et de production de masse n'influencent pas négativement sur la qualité des mâles à lâcher sur le terrain.

(iii) La densité de la population cible doit être très faible afin d'optimiser le ratio mâles stériles/mâles sauvages à lâcher. Certaines études ont montré que le ratio varie entre 7:1 et 100:1 suivant les programmes de lutte ciblant une espèce bien définie (Dyck *et al.* 2005). Plus faible est la densité de la population de terrain au moment du lâcher, mieux cela vaut car cela nécessite une moindre production en masse, donc économiquement rentable.

(iv) Une meilleure connaissance de la bio-écologie de la population cible incluant la nature des gîtes larvaires, le comportement de reproduction, la longévité, la dynamique spatio-temporelle et la capacité de dispersion des individus.

(v) *La zone d'intervention doit être isolée* afin d'éviter la possibilité d'immigration de femelles sauvages des zones voisines non traitées.

(vi) *La zone cible doit aussi contenir une seule espèce vectrice de la maladie* afin de rendre l'impact de l'intervention palpable. Cette espèce vectrice est évidemment celle qui doit être lâchée dans la dite zone.

(vii) *Le lâcher exclusif de mâles*, pour des raisons éthiques et d'efficacité. On ne saurait lâcher les femelles car non seulement elles piquent-donc source de nuisance-mais elles sont aussi vectrices d'autres maladies qui ne seront certainement pas ciblées par l'intervention. Une méthode efficace de séparation des sexes au laboratoire à moindre coût doit être développée.

(viii) *Les considérations économiques (coût/efficacité/faisabilité), les considérations éthiques* : il est nécessaire d'entreprendre une bonne communication avec toutes les parties prenantes (communautés, gestionnaires, politiques locaux et nationaux) ainsi que la conduite d'études socio-anthropologiques intégrant les dimensions humaines, culturelles et sociologiques dans le contexte du site d'intervention.

(ix) *L'intégration de la lutte génétique à d'autres approches de contrôle des anophèles*: cela passe par la stratégie de lutte intégrée (Beier *et al.* 2008) dans laquelle tous les autres moyens de lutte à savoir l'utilisation des MILDA et de la PID, les larvicides, et la lutte génétique sont complémentaires. Ces méthodes permettront de réduire les densités anophéliennes à un seuil raisonnable pour l'application de la lutte génétique. Au-delà de la LAV, la lutte intégrée contre le paludisme prend aussi en compte la dimension anthropo-sociologique (acceptabilité des moyens de lutte par les populations bénéficiaires), l'utilisation des médicaments et le développement d'un vaccin efficace.

CHAPITRE 2: METHODOLOGIE GENERALE

2.1. Cadre de l'étude

Une partie des travaux de cette thèse s'est déroulée au Burkina Faso à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) / Centre Muraz où les expériences de terrain (Partie 1) et l'évaluation des régimes larvaires au laboratoire (Partie 2) ont été menées.

Le Burkina Faso est un pays enclavé d'une superficie de 274 200 km² situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest. Il est limité, au nord et à l'ouest par le Mali; à l'est par le Niger; au sud par le Bénin, le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire.

Le climat est tropical de type soudano-sahélien (caractérisé par des variations pluviométriques considérables allant d'une moyenne de 350 mm au Nord à plus de 1 000 mm au Sud-ouest) avec deux saisons très contrastées: la saison des pluies de 3 à 6 mois (Mai à Octobre) avec des précipitations comprises entre 300 mm et 1 200 mm et la saison sèche d'environ 6 mois (Novembre à Avril) durant laquelle souffle l'harmattan (vent chaud et sec en provenance du Sahara). Le pays est subdivisé en trois principales zones climatiques (Figure 7) en fonction de la pluviométrie annuelle moyenne, la zone sahélienne au Nord (300-600 mm/an et amplitudes thermiques élevées (15 à 45°C), la zone sub-sahélienne (ou soudano-sahélienne) au centre (600-900 mm/an, entre 11° 3' et 13° 5' de latitude Nord) et la zone nord soudanienne au Sud (900-1 200 mm/an et des températures moyennes relativement basses).

La thèse a également porté sur les méthodes de standardisation de l'élevage en masse d'anophèles (Partie 3) et les tests de compétitivité sexuelle des mâles stériles en grandes cages en serre expérimentale (Partie 4). Cette partie des travaux a été menée à la Division mixte de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique et (FAO/AIEA) à Seibersdorf, en Autriche. Cette division a initié le développement de moyens d'élevage de masse, de stérilisation et de lâchers afin d'apporter un support technique à des projets de TIS à la demande de plusieurs Etats Membres. C'est le cas par exemple des projets d'étude de faisabilité de l'utilisation de la TIS pour lutter contre les vecteurs *An. arabiensis*, vecteur principal du paludisme, au Soudan et en Afrique du Sud et également contre *Ae. Albopictus*, vecteur d'arboviroses (Dengue, Chikungunya) à l'île de la Réunion et à l'île Maurice (<http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/index.html>).

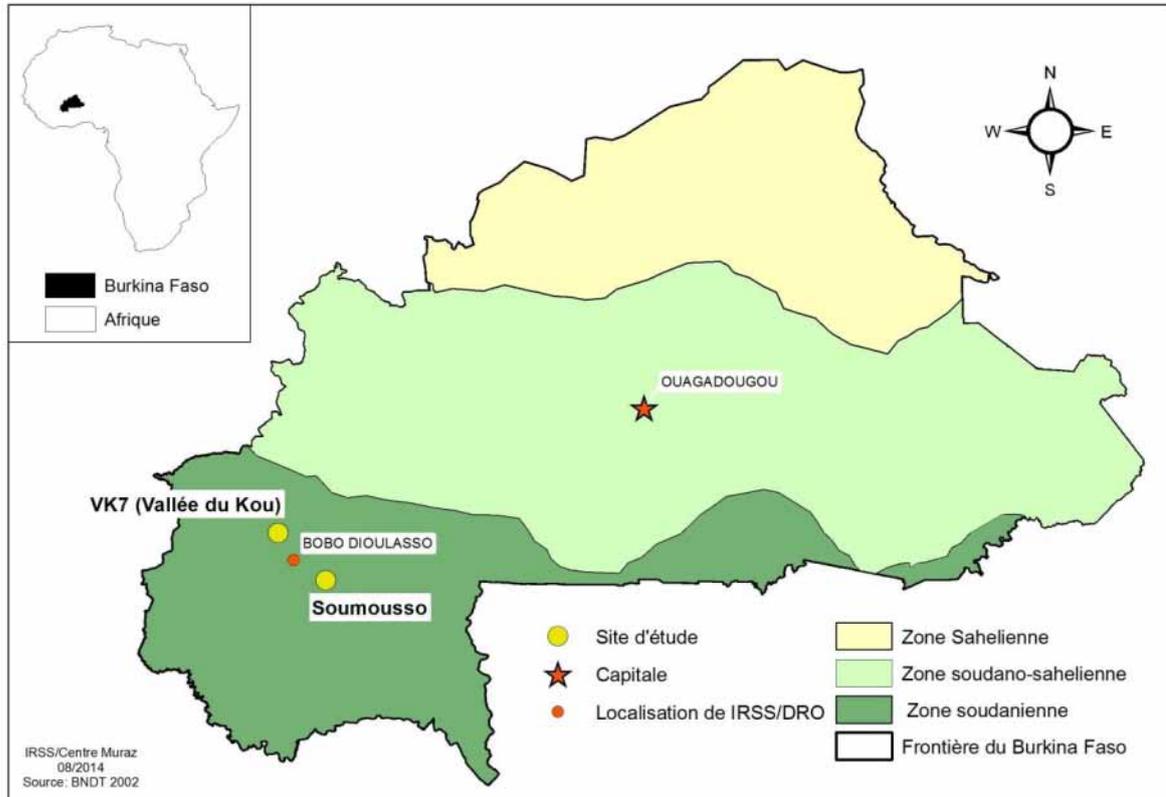


Figure 7 : Localisation des sites d'étude et zones climatiques au Burkina Faso

2.2. Sites d'études

2.2.1. La Vallée du Kou (VK7)

C'est une zone rizicole située à une trentaine de kilomètres au Nord de Bobo-Dioulasso (Sud-ouest du Burkina Faso, 4°24' O et 11°23' N) (Figure 8). Aménagée en 1972, elle s'étend sur 1 200 ha et regroupe sept villages avec une population estimée à 18 000 habitants. Les précipitations sont d'environ 1 200 mm/an. Cette zone se caractérise par deux saisons, la saison des pluies qui s'étend de Mai à Octobre et la saison sèche de Novembre à Avril. La rivière du Kou est une source permanente d'irrigation ce qui permet deux cultures/an, l'une de juillet à novembre et l'autre de janvier en mai. 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 est essentiellement assurée par *An. gambiae s.l.* et accessoirement par *An. funestus* (Baldet *et al.* 2003). La distribution d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* est sujette à une dynamique spatio-temporelle avec la première, majoritaire toute l'année (Diabaté *et al.* 2003).

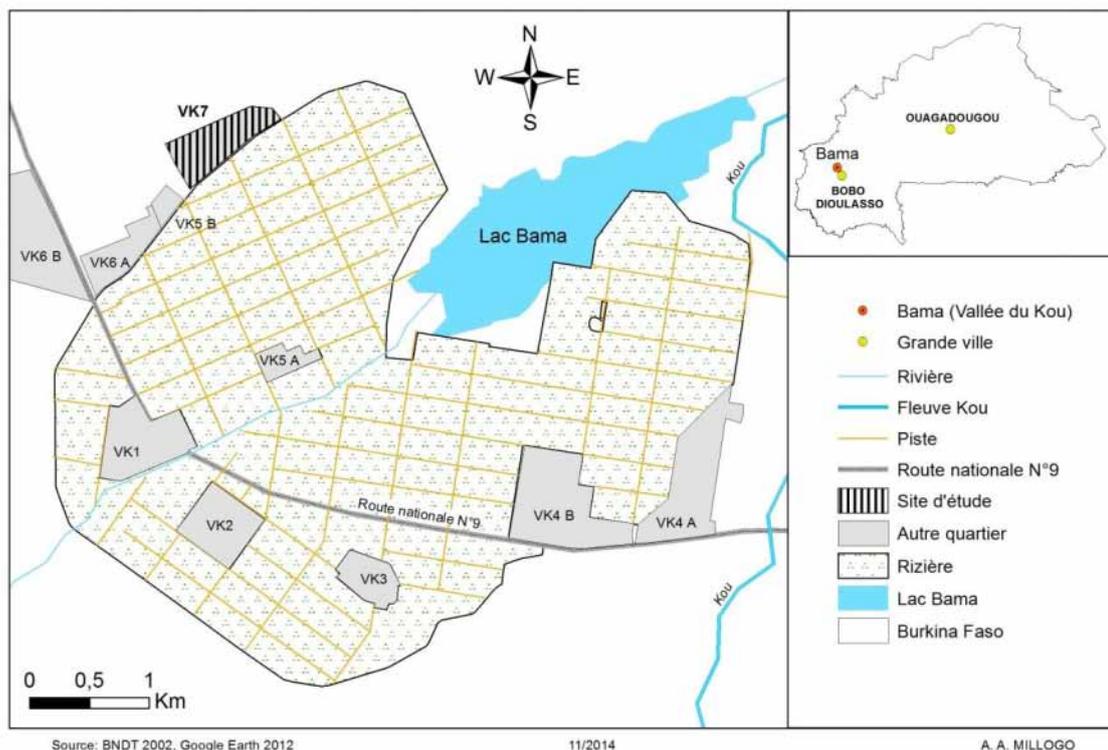


Figure 8 : Site d'étude de la Vallée du Kou (VK7)

2.2.2. Soumoussou

C'est une zone de savane située à 55 km au Sud-est de Bobo-Dioulasso (4°03' O; 11°04' N) (Figure 9) avec la présence d'un petit ruisseau semi permanent qui assure des gîtes propices au développement des moustiques. D'autres gîtes temporaires sont également représentés par des flaques d'eau de pluie appropriées pour le développement des anophèles. La saison pluvieuse s'étale de Mai à Octobre, avec une moyenne annuelle comprise entre 1 000 mm et 1 200 mm.

Cinq espèces de moustiques vecteurs du paludisme, *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. arabiensis* sont rencontrées dans ce village avec *An. gambiae* majoritaire toute l'année (Diabaté *et al.* 2006; Dabiré *et al.* 2007).

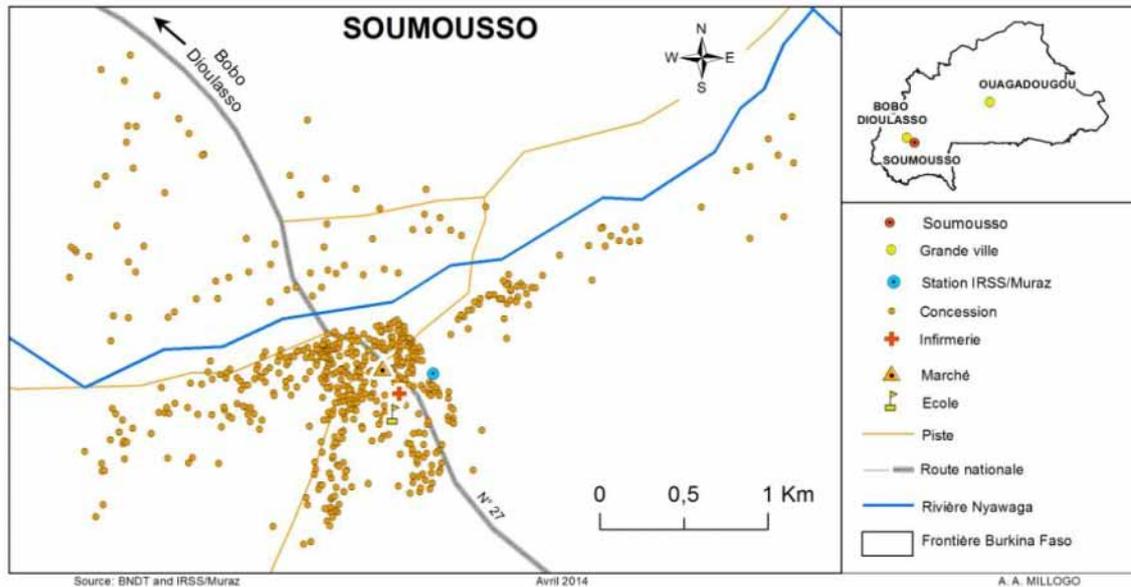


Figure 9 : Site d'étude de Soumouso

2.3. Echantillonnage de moustiques et techniques au laboratoire

2.3.1. Terrain : collecte de moustiques en milieu naturel

La collecte de moustiques réalisée dans le cadre des travaux de la Partie 1 a été effectuée au moins une fois par mois en juillet et août (VK7 en 2010), puis en juillet, août, septembre et novembre (VK7 et Soumouso en 2011). Elle a essentiellement concerné les mâles : i) en couple dans les essaims, ii) solitaires dans les essaims, iii) au repos (maisons habitées ou abandonnées, abris extérieurs), le matin mais aussi le soir, une heure avant l'essaimage, iv) nouvellement émergés des gîtes larvaires. Pour cela, différentes méthodes ont été utilisées :

- **la capture des émergents de terrain** : Des gîtes larvaires ont été recouverts d'une cage à moustiquaire (Figure 10). Les mâles qui émergent sont capturés à l'aide d'aspirateurs à bouche.



Figure 10 : Cage d'émergence des moustiques du terrain (Photo G Gimonneau)

- **la capture des mâles au repos** : Les mâles ont été collectés dans leurs lieux de repos dans les habitations à l'aide des tubes individuels ou des aspirateurs à bouche très tôt le matin entre 06:00 et 07:00. La même collecte a été répétée le soir, juste avant la formation des essaims dans les mêmes habitations (Figure 11). Les mâles ont servi pour l'étude portant sur le dosage des métabolites.

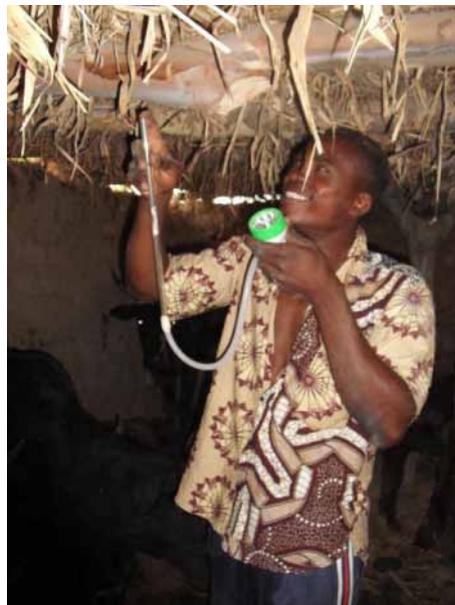


Figure 11 : Capture de moustiques en faune résiduelle (Photo MH).

- **le fauchage (F) des moustiques et des couples dans les essaims** : Les moustiques, en majorité des mâles ont été fauchés dans les essaims (Figure 12) en trois temps bien

distincts à l'aide de filet-fauchoirs (Figure 13). La première fauchée (F1) est pratiquée 5 mn après l'apparition du premier mâle (début d'essaim), puis la seconde (F2), lorsque le pic de l'essaim est atteint soit 10 mn après F1 et la dernière (F3), lorsqu'il n'y a plus que les derniers mâles soit au total après 25 mn d'essaimage. Les couples formés au cours de l'agrégation ont aussi été collectés et numérotés suivant l'ordre d'apparition.



Figure 12 : Essaimage en cours où des couples de moustiques se forment (Photo PS Sawadogo)



Figure 13 : Fauchage de mâles et de couples de moustiques dans les essaims à l'aide d'un filet-fauchoir (Photo MH).

Les spécimens ainsi collectés ont été identifiés morphologiquement (Gillies et De Meillon, 1968) et seuls les moustiques mâles d'*An. gambiae s.l.* ont été conservés pour les analyses biochimiques. Pour cela, ils ont été d'abord anesthésiés à la vapeur de chloroforme afin d'arrêter tout processus métabolique puis transportés en bouteille d'azote liquide au laboratoire. Ils ont été conservés à -80°C en attendant le dosage des principaux métabolites (sucres totaux, glycogène, protéines et lipides) par spectrophotométrie.

2.3.2. Travaux de laboratoire

a. Colonies et production de masse

– Colonies de laboratoire

Au cours de nos expérimentations au laboratoire (cf. chapitre 3, Partie 2), nous avons utilisé une souche d'*An. coluzzii*. La souche a été créée en août 2008 à partir de femelles gravides collectées à la Vallée du Kou (4°24'O, 11°23'N). Les larves ont été nourries à la TetraMin® Baby et élevées dans les conditions de température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, d'humidité relative maintenue à 75 % en moyenne et une alternance jour/nuit de 12h. Pour la maturation des œufs, les femelles ont pu se gorger de sang sur des lapins. Mâles et femelles ont été approvisionnés avec une solution de glucose 5% à volonté.

Cette souche a été dupliquée au laboratoire de l'unité d'entomologie de la Division mixte FAO/AIEA, Seibersdorf (Autriche) en janvier 2013 pour les tests de compétitivité sexuelle des mâles stériles (cf. chapitre 3, Partie 4). Pour cela, les moustiques ont été élevés à une densité de 200 larves par bac (30 x 40 cm) dans 1 litre d'eau distillée et nourris d'une poudre préalablement développée par l'AIEA pour l'alimentation des larves (Poudre de thon : 5 g ; Poudre de foie de bœuf : 5g ; complexe de vitamines : 4,6 g dilués dans 1 litre d'eau distillée) (Figure 14).



Figure 14 : Mixture de 5 g de poudre de thon, de 5g de poudre de foie de bœuf et de 4,6g de complexe de vitamines dilués dans 1 litre d'eau distillée développée par l'AIEA pour l'alimentation des larves d'anophèles

Les larves ont été nourries quotidiennement de ce mélange avec des doses croissantes au cours du développement. Lors des deux premiers jours, 0,02 ml/larve/jour ont été administrés, puis 0,04 ml/larves/jour pour les troisième et quatrième jours, puis 0,08 ml/larves/jour jusqu'à la nymphose (obtention des pupes). La colonie a été maintenue dans les conditions contrôlées à l'insectarium ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ HR et en alternance jour/nuit de 12h avec une heure simulée aube et crépuscule). Les adultes ont été maintenus dans des cages (30x30x30 cm) et nourris avec une solution de saccharose 5% additionnée de méthylparaben (antifongique; Benedict *et al.* 2009a) *ad libitum*. Les femelles ont été approvisionnées en sang de bœuf pour le développement des œufs (cf. chapitre 2, 2.3.2 b) puis des bols contenant des éponges humidifiées d'eau distillée et recouverts de papier filtre Whatman N° 1 ont servi de pondoires pour les femelles. Afin de permettre la synchronisation des l'éclosion, les papiers filtre, sur lesquels les œufs étaient pondus, ont été conservés pendant deux à quatre jours dans des boîtes de Petri scellées à l'aide de Parafilm® dans des conditions de laboratoire avant d'être mis en eau.

La souche d'*An. arabiensis* originaire du Soudan (Dongola) a été élevée dans les mêmes conditions. En effet, le Soudan et l'AIEA collaborent dans le cadre d'un projet de développement de la TIS le long du fleuve Nil, au nord du Soudan. Pour ce faire, cette souche a été dupliquée au laboratoire de l'unité d'entomologie de la Division mixte FAO/AIEA, Seibersdorf (Autriche). L'augmentation de la production d'adultes a permis l'élevage de

masse à partir des cages de production de masse. Cela a permis de développer la méthode de quantification d'œufs (cf. chapitre 3, Partie 3).

– *Rack de production de masse de larves et de pupes*

Le prototype de plateaux pour les larves est un système de râtelier appelé rack (Figure 15B) pouvant accueillir 50 plateaux (Figure 15A). Il a été testé pour l'élevage en masse de larves et de pupes d'*An. arabiensis*. Le nombre de pupes collectées a été estimé à l'aide de petits tubes préalablement définis pour 500 et 1 000 pupes (Figure 15C).

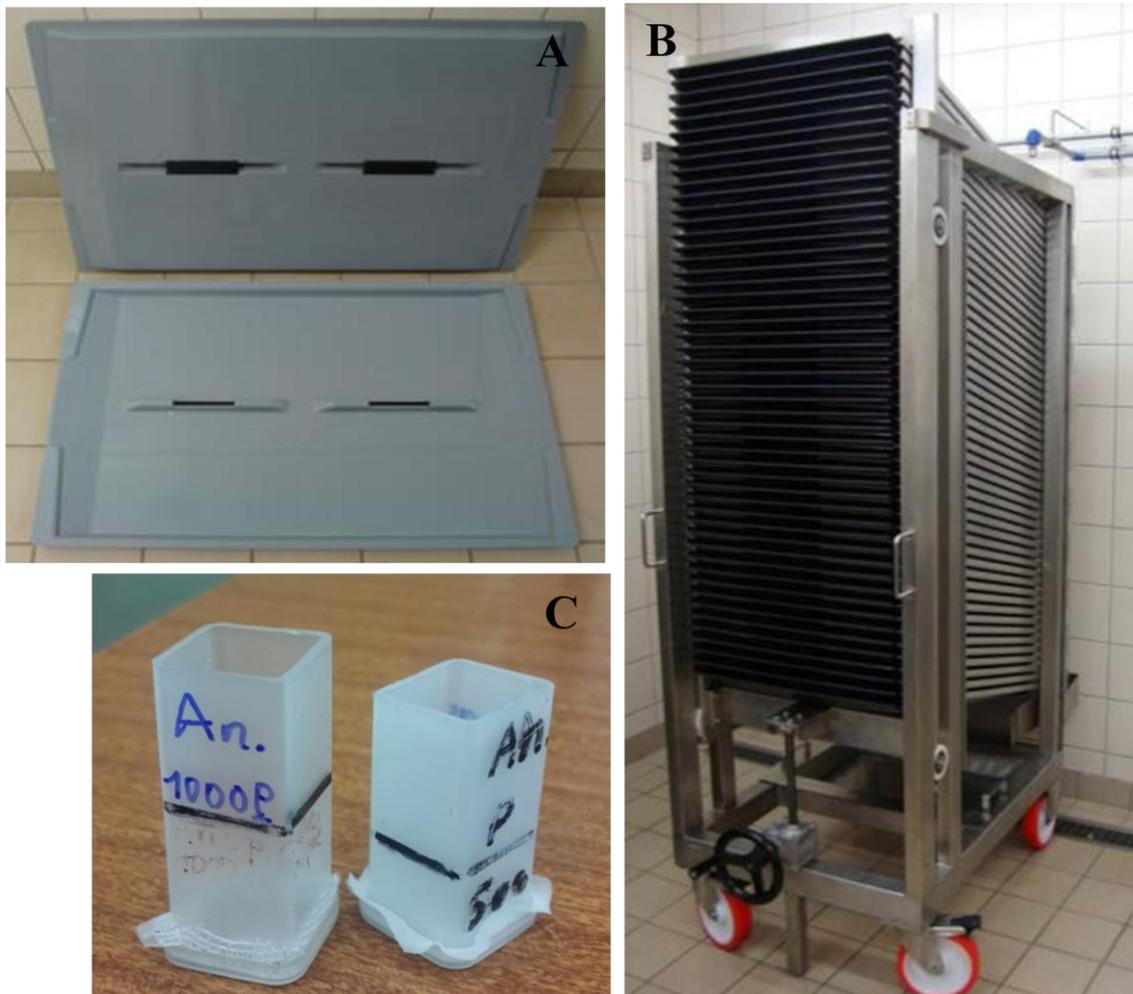


Figure 15 : Plateau individuel (100 x 60 x 3 cm) (A) et Rack (B) portant 50 plateaux à larves sur une surface d'1m² pour la production de masse. Estimateur gradué à 500 et 1 000 pupes (C).

– *Cages de production de masse d'œufs*

La production de masse a été initiée à partir de cages de production de masse (Figure 16).

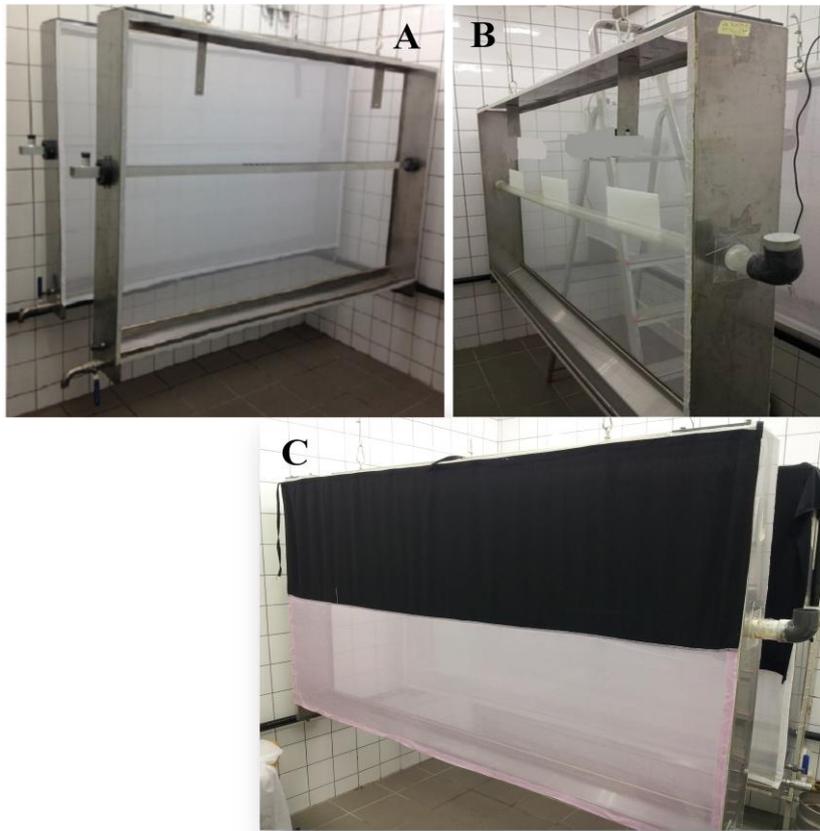


Figure 16 : Cage de production de masse d'œufs : ancien prototype (A), nouveau prototype (B), toile noire recouvrant la moitié supérieure du nouveau prototype de la cage (C)

La cage mesure 2 m de long sur 1 m de large et 10 cm ou 20 cm d'épaisseurs. La cage est traversée dans sa longueur par un tube en aluminium perforé de trous de 4 cm de diamètre recouverts de mèche fine permettant l'accès à la solution sucrée par les moustiques (Figure 16A). Le fond de la cage est formé en V et peut contenir de l'eau pour déposer des pupes (pour l'émergence) et servir de site de ponte pour les femelles. Ce modèle est aussi muni d'une soupape d'admission utilisée pour rincer à l'eau le fond de la cage tandis que le coude à rotation libre de la soupape de sortie peut être utilisé pour introduire les pupes (coude positionné vers le haut) ou pour recueillir les œufs et les adultes morts (Figure 17A-D) (coude positionné vers le bas) (Figure 17A). Deux ouvertures de 20 cm de diamètre chacune situées de part et d'autre des extrémités supérieures de la cage sont recouvertes de tissu moustiquaire et permettent d'administrer les repas sanguins pendant 2 heures/jour. Ce modèle de cage a été

modifié en remplaçant le tube en aluminium par un tube plastique muni de trois fines ouvertures de 25 cm chacune où sont fixés des papiers Whatman N°1 (25 cm de long et 10 cm de haut) pour améliorer l'accès permanent au sucre 5% (Figure 16B). Un tissu noir recouvrant la moitié supérieure de la cage a également été ajouté afin de servir d'abri aux moustiques durant la période de photophase (Figure 16C). La production de masse obtenue a servi à tester le système de rack d'élevage de larves et pupes (Figure 15B)



Figure 17 : Système de tamisage (A), à l'aide de tamis de différentes tailles (B) pour séparer les œufs (C) des adultes morts (D).

b. Techniques au laboratoire

– Administration des repas sanguins

Le système d'alimentation au sang est constitué d'une plaque circulaire en aluminium de 17 cm de diamètre, 1 cm d'épaisseur et un câble connecté à un Hemotek capable de maintenir la température de la plaque en aluminium à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Une membrane en collagène de 20 x 20 cm fixée autour de la plaque chauffante avec un anneau en plastique (Figure 18A) permet de retenir 50 ml de sang entre la membrane et la plaque d'aluminium chauffante. Du sang de bœuf reçu de l'abattoir et exempt de tous pathogènes est stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Le sang est progressivement décongelé à 4°C puis porté à température ambiante et enfin dans l'eau tiède. L'Hemotek est mis en marche au moins 30 mn avant le début de chaque nourrissage et 50 ml de sang est injecté entre la plaque en aluminium et la membrane en utilisant une seringue de type Luer-lock (BD, Franklin Lakes, NJ, 50 ml) (Figure 18B). Le dispositif est déposé à chaque séance de nourrissage sur les cages 30x30x30 cm (pendant 30

mn) et sur les cages de production de masse (2 heures) afin que les femelles se gorgent au travers de la membrane de collagène.

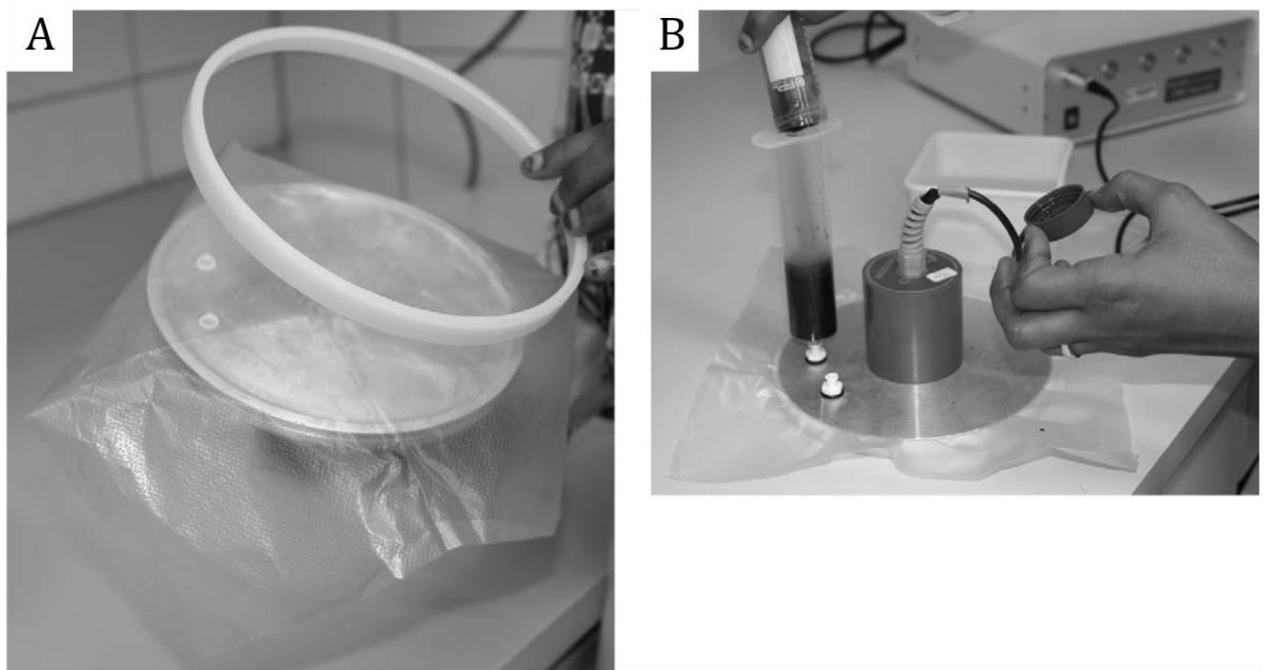


Figure 18 : Dispositif de nourrissage au sang : A. Une membrane en collagène de 20 x 20 cm fixée autour de la plaque chauffante en aluminium avec un anneau en plastique. B. Injection de 50 ml de sang entre la plaque en aluminium et la membrane à l'aide d'une seringue (Damiens *et al.* 2013b).

– ***Dissections et mesures de la taille des ailes***

Les ailes ont été disséquées à l'aide de pinces ou d'aiguilles sous une loupe binoculaire et placées entre lames et lamelles. Elles sont ensuite photographiées et leur taille mesurée de l'alula à l'extrémité distale en excluant les franges (Figure 19) grâce au logiciel Image J1.41.0. Cette longueur élevée au cube (L^3) est considérée comme un indice de la taille du moustique (Briegel *et al.* 1990). Pour évaluer la symétrie, la longueur des ailes (gauche et droite) de chaque moustique a été mesurée 3 fois puis comparée entre les mâles accouplés et les mâles non accouplés.

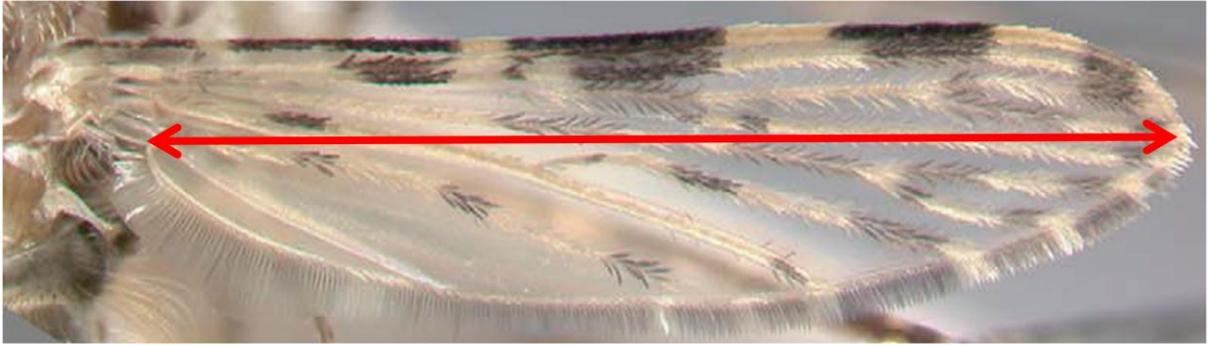


Figure 19 : Aile d'un moustique. La double flèche indique la mesure effectuée entre l'alula (extrémité gauche de la flèche) et l'extrémité distale de l'aile excluant les franges (extrémité droite de la flèche) (Coetzee *et al.* 2013).

– ***Dissection de la spermathèque***

La dissection du dernier segment de l'abdomen dans une goutte d'eau distillée a permis l'extraction de la spermathèque. La spermathèque est par la suite ouverte à l'aide d'aiguilles à dissection afin de déterminer le statut d'insémination de la femelle (Figure 20).

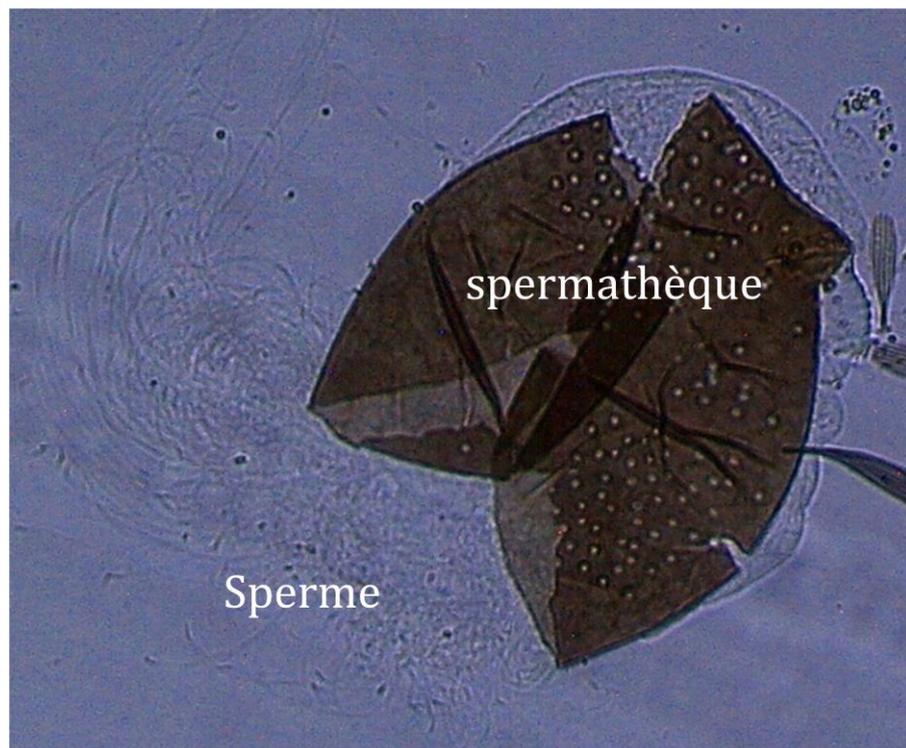


Figure 20 : Spermathèque positive libérant son contenu (Photo MH)

– **Identification moléculaire des moustiques par polymerase chain reaction (PCR)**

L'identification a concerné les échantillons de terrain (VK7 et Soumousso, Burkina Faso) selon le protocole décrit par Santolamazza *et al.* (2008) à partir d'extrait d'ADN. Cette méthode permet d'identifier simultanément *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*.

La procédure comprend différentes étapes dont une extraction au chelex, une amplification *in vitro*, une migration sur gel d'agarose (1,5%) et enfin une révélation sous rayonnement ultra violet (cf. Annexe 1).

c. Techniques de dosages des métabolites (cf. chapitre 3, Partie 1)

Le contenu total de lipides, protéines, sucres et glycogène a été dosé sur le même individu en utilisant le protocole de Rivero *et al.* (2007) (cf. Annexe 2).

– **Extraction**

Le dosage de chaque métabolite est précédé par son extraction. Chaque moustique est placé individuellement dans 200µl de méthanol 80% puis broyé à l'aide d'un broyeur électrique. Le broyat est vortexé puis séparé en deux aliquotes de 70µl, l'un pour l'analyse des protéines et l'autre pour l'analyse des sucres, du glycogène et des lipides (Figure 21).

L'aliquote des lipides, sucres et glycogène est additionné de 680µl de chloroforme/méthanol (1:2) et de 100 µl de sulfate de sodium. Après centrifugation pendant 15 minutes à 13 000trs/mn, le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage séparé des sucres et des lipides à raison de 350 µl pour chaque métabolite. Le culot est préservé pour l'analyse du glycogène (cf. Annexe 2).



Figure 21 : Dosage des métabolites. (A) broyage du moustique, (B) centrifugation, (C) dosage sous hotte aspirante et, (D) lecture au spectrophotomètre Thermo Multiskan (Photo MH).

– *Dosage des métabolites*

Dosage des protéines (selon Bradford, 1976)

Le dosage des protéines selon la méthode de Bradford est basé sur la formation d'un complexe de coloration bleue en milieu acide entre les protéines et le Bleu Brillant de Coomassie G-250. Le Coomassie se lie à la protéine par des interactions non-covalentes (ponts hydrogène, interactions hydrophobes et interactions ioniques) et sa longueur d'absorption maximale augmente de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu) proportionnellement à la concentration de protéines contenues dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage à partir

d'une gamme de standards (cf. Annexe 2) de l'albumine de sérum bovin (ASB) a permis de calculer les quantités de protéines contenues dans chaque échantillon.

Au volume de 70µl du surnageant initial, ont été ajoutés 730 µl de liquide physiologique puis 200 µl du réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, USA). Il faut attendre 15 minutes pour permettre le développement de la coloration puis lire l'absorbance à 595 nm.

Dosage des sucres

En milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques des hydrates de carbones sont hydrolysées. Les oses ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour donner des dérivés furfuriques. La fonction aldéhyde des dérivés furfuriques se condense en milieu acide avec l'hydroxyle d'un composé alcoolique pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent entre 610 et 700 nm. Une courbe d'étalonnage à partir d'une gamme de standards de glucose (cf. Annexe 2) a permis de calculer les quantités de sucres contenues dans chaque échantillon.

Le volume prélevé est évaporé en évitant la dessiccation (laisser une petite goutte au fond du tube). On ajoute 1 000 µl de réactif d'Anthrone (Sigma-Aldrich, USA) puis on chauffe pendant 15 minutes. Après refroidissement l'absorbance est lue à 625 nm.

Dosage du glycogène

Le glycogène précipite dans une solution de sulfate de sodium. L'ajout du méthanol permet la dissolution des sucres qui restent dans le surnageant. Le précipité réagit à chaud avec le réactif d'Anthrone pour donner une coloration bleu-vert qui absorbe à 625nm au spectrophotomètre (Van Handel, 1985a). Une courbe d'étalonnage (identique à celle des sucres) à partir d'une gamme de standards (cf. Annexe 2) de glucose a permis de calculer les quantités de glycogène contenues dans chaque échantillon.

Le tube contenant le culot est renversé sur du papier absorbant pour éliminer le reste de solvant. On ajoute 1 000 µl de réactif d'Anthrone puis on chauffe pendant 15 minutes. Après refroidissement l'absorbance est lue à 625 nm.

Dosage des lipides

Les lipides sont solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, l'hexane, l'acétone, l'éthanol, le chloroforme ou le méthanol. Les lipides totaux sont extraits dans un mélange de

chloroforme-méthanol. Le traitement à l'acide sulfurique à chaud convertit les lipides insaturés en dérivés d'acides sulfoniques. Ces derniers développent une coloration rouge avec le réactif de Vanilline (Van Handel, 1985b) qui absorbe à 525 nm. Une courbe d'étalonnage à partir d'une gamme de standards d'huile végétale (cf. Annexe 2) a permis de calculer les quantités de lipides contenues dans chaque échantillon.

Le volume prélevé (350µl) est chauffé jusqu'à dessiccation totale à 95°C dans des blocs chauffants. 37,5 µl d'acide sulfurique 96% ont été ensuite ajoutés puis chauffés pendant 5 minutes. Après refroidissement on ajoute 1 000 µl du réactif de Vanilline (Sigma-Aldrich, USA) puis on attend 10 à 15 minutes pour lire l'absorbance à 525 nm.

Calcul de la concentration des différents métabolites

Des densités optiques (DO) (ou absorbances) de chaque gamme de standards (cf. Annexe 2), on retranche la DO du contrôle (1er puits de la gamme de standards) pour obtenir les DO réelles de la gamme (Figure 22). A chaque type de métabolite à doser correspond une gamme de standards: l'albumine du sérum de bovin (ASB) pour les protéines, le glucose pour les sucres et le glycogène et l'huile végétale pour les lipides. Une droite de régression des DO est tracée en fonction des différentes concentrations propres à chaque gamme de standards à l'aide du logiciel EXCEL. La droite obtenue est une fonction affine d'équation $y=ax+b$ où y est la DO, a est la pente, x est la concentration de standard (ou d'un échantillon) et b l'ordonnée à l'origine. La régression obtenue est bonne pour un coefficient de corrélation R^2 compris entre 0,9 et 1 ($0,9 < R^2 < 1$). Toutes les concentrations des métabolites sont déduites par calcul de ces courbes. Par identification, on peut tirer la formule suivante pour estimer la quantité de métabolite [C]:

$$[C] = (DO_{ECH} - b) / a$$

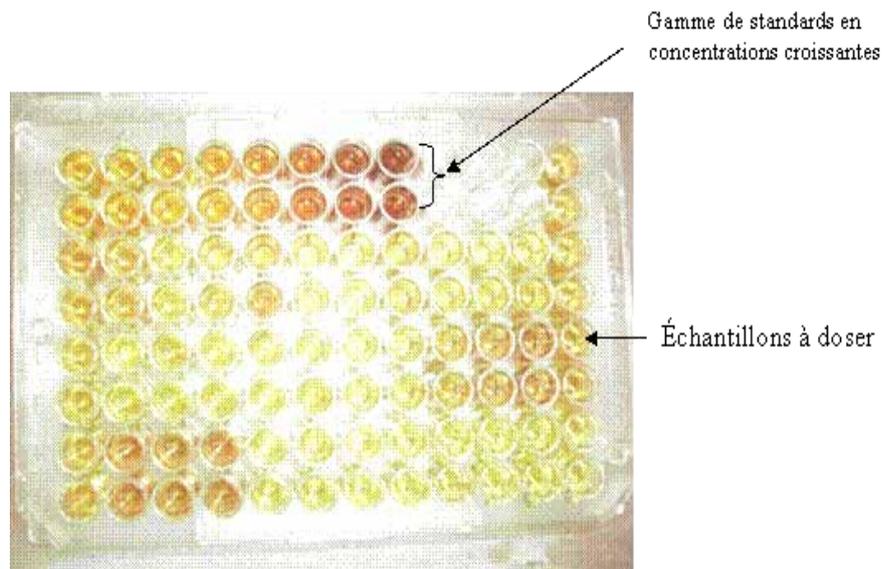


Figure 22 : Dosage d'un métabolite. L'intensité de la coloration du puits est fonction de la concentration. Pour chaque type de métabolite, 300 μ l de l'échantillon ont été mis en répliques sur des plaques de 96 puits.

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE 1: Rôle des réserves nutritionnelles et de la taille des mâles sur le comportement d'essaimage et d'accouplement chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae* en condition naturelle

Les résultats de cette étude ont été publiés dans les articles:

Maïga H, Dabiré RK, Lehmann T, Tripet F and Diabaté A. Variation in Energy Reserves and Role of Body Size in the Mating System of *Anopheles gambiae*. J Vector Ecol. 2012; 37(2):289-297.

Maïga H, Niang A, Sawadogo SP, Dabiré RK, Lees RS, Gilles JR, Tripet F, and Diabaté A. Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success. Acta Trop. 2014; 132 Suppl: S102-7.

1.1. Introduction

L'échec de certaines campagnes de lâchers de mâles stériles (Benedict et Robinson, 2003) a révélé la nécessité d'investiguer plus profondément le comportement de reproduction des mâles en milieu naturel (Ferguson *et al.* 2005; Takken, 2005). Ces travaux devraient permettre de prendre en compte certaines caractéristiques des mâles en milieu naturel afin d'optimiser l'élevage au laboratoire. Il est important que le comportement des mâles de laboratoires ne diffère pas de celui de leurs congénères sauvages en termes de longévité, de capacité de dispersion ou de compétitivité sexuelle (Howell et Knols, 2009). Plusieurs hypothèses ont été développées pour expliquer le comportement d'accouplement et d'essaimage des mâles dans les essais (Diabaté *et al.* 2011). Il en ressort que la compétition entre mâles est rude et que seuls les mâles ayant certains critères seraient favorisés. Parmi ces critères, figurent la taille du mâle (Yuval *et al.* 1993; Voordoum et Koella, 2007; Huho *et al.* 2007), l'âge (Chambers et Klowden, 2001; Huho *et al.* 2006, 2007, Sawadogo *et al.* 2013) et les réserves énergétiques (Yuval *et al.* 1994, Huho *et al.* 2007, Gilles *et al.* 2011, Damiens *et al.* 2012).

Les réserves nutritionnelles accumulées au cours du développement larvaire et au cours de chaque repas sucré pendant la vie de l'adulte sont des facteurs déterminants pour la survie et le succès reproductif (Foster, 1995). Pour s'accoupler le mâle a besoin de voler et cela nécessite de métaboliser les sucres et le glycogène afin de fournir l'énergie nécessaire au vol (Yuval *et al.* 1994, Bargielowski *et al.* 2012). Par conséquent, une étude globale du niveau de

la variation des ressources énergétiques disponibles chez les mâles à différents états physiologiques et collectés à différents moments de la journée permettrait une estimation de l'énergie allouée aux activités essentielles telles que l'essaimage et l'accouplement.

Nous proposons donc ici d'étudier la variation des réserves énergétiques entre les mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* collectés à l'émergence, au repos et pendant l'essaimage et ainsi de déterminer les budgets énergétiques (sucres totaux et glycogène) des mâles des essais collectés sur nos deux sites d'études (VK7 et Soumouso). En comparant le budget énergétique des mâles s'étant accouplés avec ceux n'y étant pas parvenus au cours de la période d'essaimage, il s'agissait d'évaluer si le succès d'accouplement est lié aux réserves énergétiques disponibles ou non. Enfin, la taille des mâles a été également prise en compte.

1.2. Méthodologie

Les mâles de moustiques ont été collectés dans les essais et les sites de repos en juillet et août 2010 (VK7), puis en juillet, août, septembre et novembre 2011 (VK7 et Soumouso). Les moustiques collectés à l'émergence, tôt le matin (entre 06:00 et 07:00), dans l'après-midi (entre 17:00 et 18:00) et après le coucher de soleil (autour de 18:30) selon le protocole précédemment décrit (cf. chapitre 2, 2.3.1) ont permis de quantifier les variations des réserves énergétiques au cours de la journée et pendant l'essaimage (F1=début, F2=pic et F3=fin). Les réserves énergétiques des mâles accouplés et des mâles non accouplés dans les essais ont été évaluées selon les méthodes décrites plus tôt (cf. chapitre 2, 2.3.2 c) puis comparées afin de voir si le succès dans l'accouplement était lié à la teneur en glucides.

La taille et la symétrie des ailes (gauche et droite) ont également été évaluées (cf. chapitre 2, 2.3.2 b). Nous nous sommes enfin intéressés aux couples de moustiques collectés afin de déterminer si la taille et la symétrie des ailes sont impliquées dans le choix du partenaire sexuel et du succès à l'accouplement.

1.3. Résultats

1.3.1. Variations des réserves énergétiques en fonction du temps et de l'activité des mâles

Les sucres totaux, le glycogène, les lipides et les protéines des différents groupes de moustiques ont été quantifiés. Les mâles au repos avaient significativement plus de réserves en sucres totaux que les mâles nouvellement émergés (Mann-Whitney $U=218$; $P<0,0001$;

Figure 23A) ainsi que les mâles collectés dans les essais ($U=1204$; $P<0,0001$). Aucune différence significative n'a été constatée entre les mâles nouvellement émergés et les mâles des essais ($U=716$; $P=0,38$). Toutefois, la différence était significative entre ces deux groupes lorsque les mâles des essais avaient été collectés seulement cinq minutes après le début de l'essaimage ($U=110$, $P=0,0028$).

Pour les réserves en glycogène, seuls les mâles au repos comparés aux mâles des essais ont montré une différence ($U=1879$; $P=0,0146$; Figure 23B). Les réserves en lipides et en protéines n'ont pas varié de façon significative entre les groupes ($P>0,05$; Figures 24C-D).

Lorsque les réserves des mâles collectés au repos (matin et soir) et dans les essais ont été comparées (Tableau I) des différences significatives en sucres totaux ($P<0,0001$, Kruskal Wallis) et en glycogène ($P=0,039$ Kruskal Wallis test) ont été observées entre les trois groupes. Les mâles au repos collectés le matin, ont montré la plus forte réserve en sucres suggérant que 59% des sucres totaux sont brûlés pendant le repos avant même que les mâles participent aux essais au crépuscule. De même, les réserves en glycogène sont plus élevées chez les mâles au repos collectés le matin mais subissent une réduction de 32% le soir à l'heure des essais (Tableau I). Aucune différence en lipides et protéines n'a été observée entre les différents groupes ($P>0,05$, Tableau I).

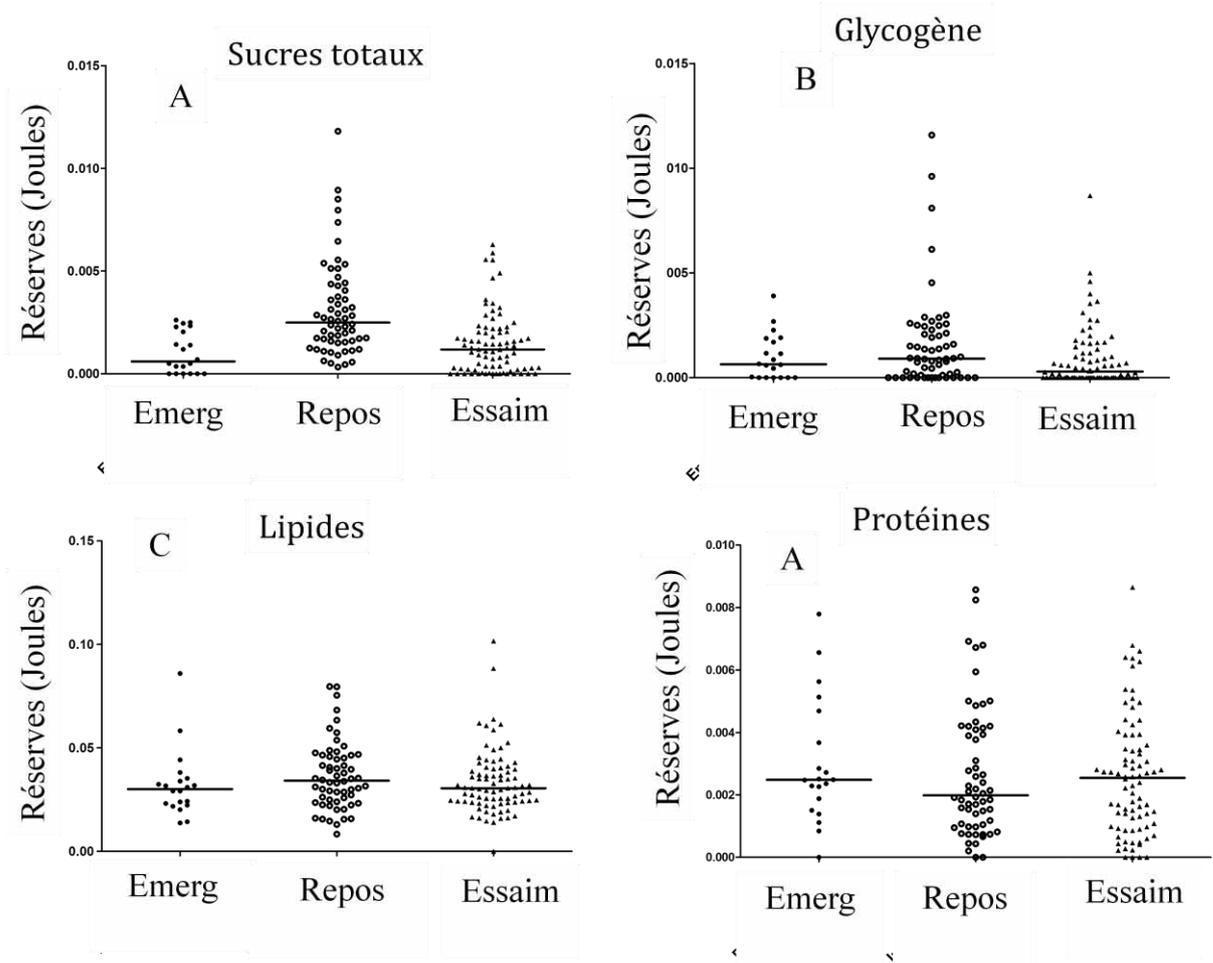


Figure 23 : Comparaison des réserves énergétiques des mâles nouvellement émergés (Emerg), des mâles au repos (matin + soir) et dans des essaims (pic)

Tableau I : Valeurs moyennes des sucres totaux, du glycogène, des lipides, des protéines contenues dans différents groupes de moustiques en fonction du temps (matin, soir, essaim) et de l'activité

	Mâles au repos (matin)	Mâles au repos (soir)	Mâles des essaims	<i>P</i> (<i>H</i> ; <i>df</i>)
Sucres totaux (J)	4,4 x 10 ⁻³ ±0,0005	1,8 x 10 ⁻³ ±0,0002	1,5 10 ⁻³ ±0,0002	<0,0001* (40,47; 2)
Glycogène (J)	1,9 x 10 ⁻³ ±0,0005	1,3 x 10 ⁻³ ±0,0003	0,9 x 10 ⁻³ ±0,0002	0,039* (6,48; 2)
Lipides (J)	39 x 10 ⁻³ ±0,003	34 x 10 ⁻³ ±0,003	34 x 10 ⁻³ ±0,002	0,121 (4,22; 2)
Protéines (J)	2,9 x 10 ⁻³ ±0,0004	0,0025±0,0003	2,6 x 10 ⁻³ ±0,0002	0,876 (0,26; 2)

J indique l'unité d'énergie (Joule) ; * moyennes significatives. Un total de 30 mâles collectés le matin, 30, le soir dans 20 concessions, 162 mâles des essaims (54 essaims) ont servis aux analyses.

1.3.2. Budget énergétique des mâles des essaims d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae*

Les réserves en sucres totaux des moustiques collectés en F1 (5mn après le début de l'essaimage) étaient plus élevées que celles des mâles collectés en F3 (fin de l'essaimage, 25 min après le début) chez chacune des deux espèces, *An. coluzzii* et *An. gambiae* (Mann Whitney test VK7 : U=758, *P*=0,0004, Figure 24A et Soumouso: U= 105, *P*=0,0497, Figure 24B). Il était de même pour les réserves en glycogène (VK7 : U=837, *P*=0,022, Figure 24C et Soumouso : U=83, *P*=0,023, Figure 24D). Ces résultats suggèrent que l'activité d'essaimage impliquerait environ 50 à 60 % des réserves en sucres (VK7 : 48,5 %, Soumouso : 56,2 %) et en glycogène (VK7 : 53,1 %, Soumouso : 59 %). Dans l'ensemble, lorsque les réserves en glucides (sucres totaux et glycogène) ont été combinées, la dépense énergétique pour l'essaimage d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* était 52,4 % et 58,1 % des réserves initiales, respectivement.

Les réserves en sucres totaux chez les mâles des essaims à Soumouso étaient significativement différentes de celles des mâles des essaims à VK7 (U=2718, *P*<0,0001).

Toutefois, d'autres comparaisons de réserves énergétiques entre les mâles au repos d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* collectés à Soumouso n'ont pas montré de différence suggérant que ce sont les différences écologiques entre les sites qui pourraient être à l'origine des variations observées (sucres : $U=231$, $P=0,71$, glycogène : $U=216$, $P=0,5$). Contrairement aux mâles collectés dans les essais, les teneurs en glycogène étaient significativement plus élevées chez les mâles nouvellement émergés à Soumouso qu'à VK7 ($U=58$, $P=0,011$).

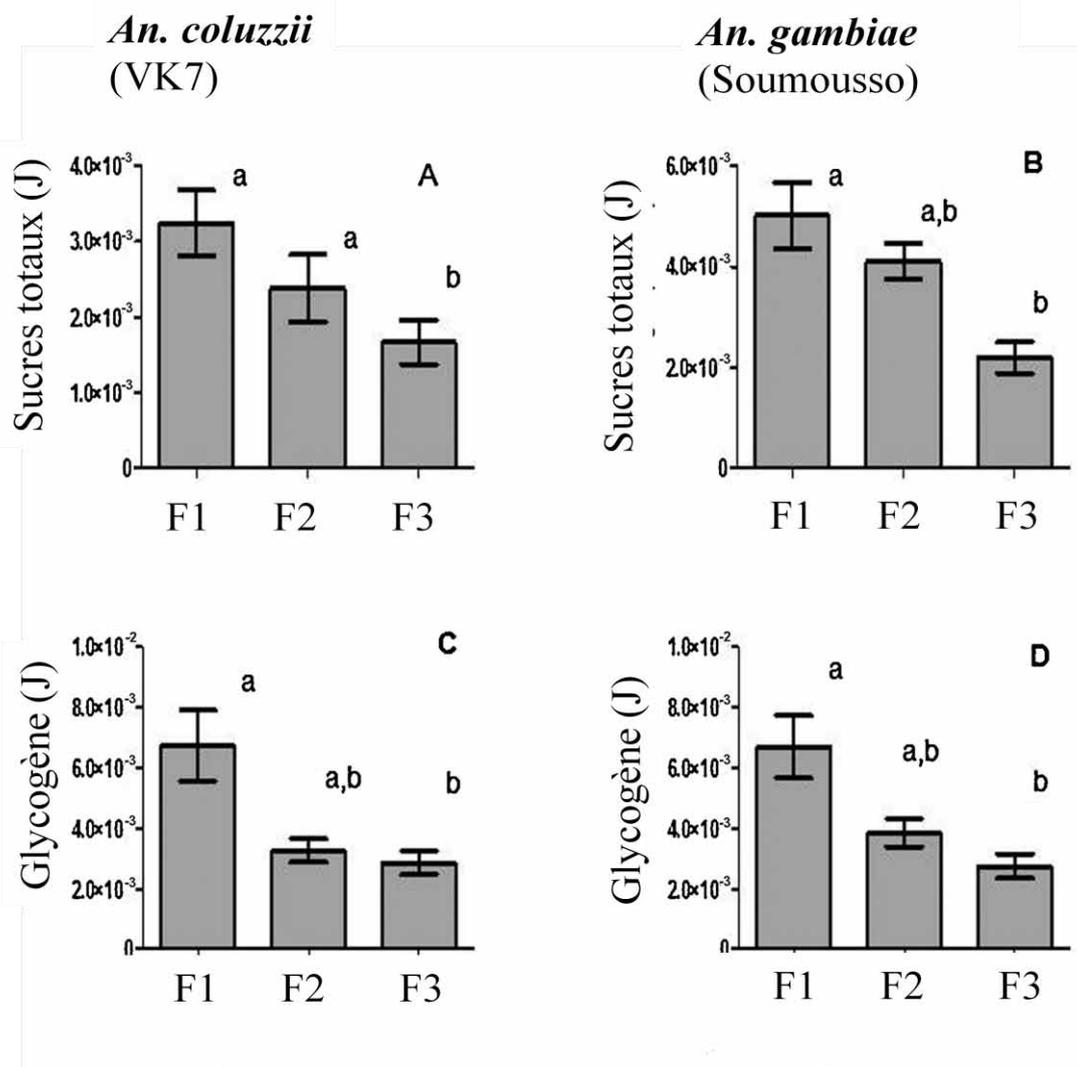


Figure 24 : Budget énergétique (sucres totaux (A et B) et glycogène (C et D)) des mâles (collectés au début (F1), au pic (F2) et à la fin de l'essaimage (F3)) d'*An. coluzzii* (A et C) et d'*An. gambiae* (B et D). Les mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* ont été collectés respectivement à VK7 et à Soumouso. Les graphes du même groupe ayant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents ($P>0.05$).

1.3.3. Réserves énergétiques des mâles accouplés et non accouplés dans les essaims

Un total de 110 mâles pris en couples et 150 non accouplés d'*An. coluzzii* a été collecté pendant trois mois (juillet, août et novembre) à VK7. Les analyses colorimétriques ont montré que les teneurs en glycogène ($U=8147$, $P=0,8$) et en sucres totaux ($U=7886$, $P=0,5$) étaient similaires au sein des deux groupes.

1.3.4. Implication de la taille des ailes dans le choix du partenaire sexuel et du succès à l'accouplement

La taille des ailes considérée comme un proxy de la taille du moustique a été mesurée. Les mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* accouplés sont relativement plus grands que les autres mâles des essaims (*An. coluzzii* : $t=2,09$, $df=348$, $P=0,036$, Figure 25A; *An. gambiae*: $t=2,97$, $df=56$, $P=0,0043$, Figure 25B). La taille des mâles des essaims ne varie ni en fonction du site de collecte ni selon qu'ils aient été collectés au début, au pic ou à la fin de l'essaimage (VK7 : ANOVA $P=0,116$, $F=2,16$, Figure 25A Soumouso : $P=0,128$, $F=2,08$, Figure 25B). La taille des mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* accouplés est principalement distribuée autour d'une valeur intermédiaire (Figure 26B, D). Nous avons aussi observé une faible corrélation entre la taille des mâles et celle des femelles pris en couples (Figure 26A, C), suggérant que dans nos sites d'études, l'accouplement chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* ne se ferait pas suivant la similitude des tailles.

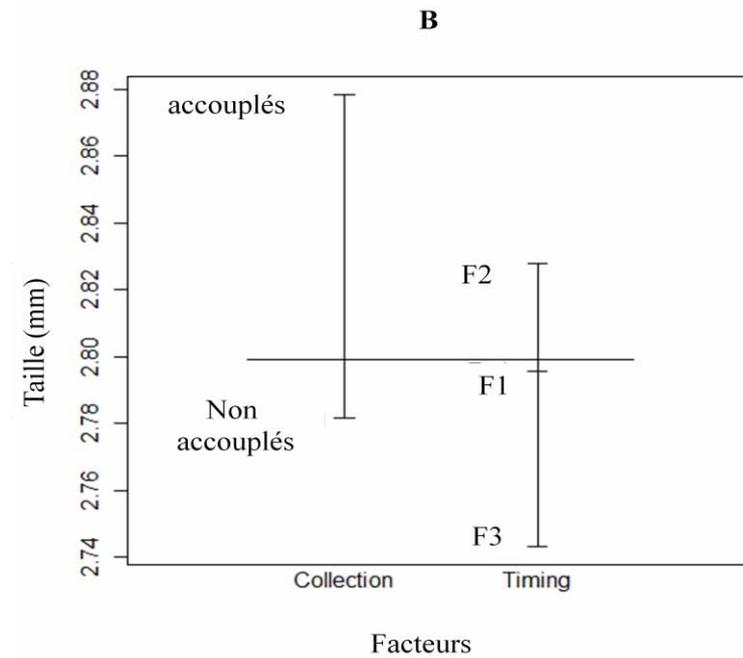
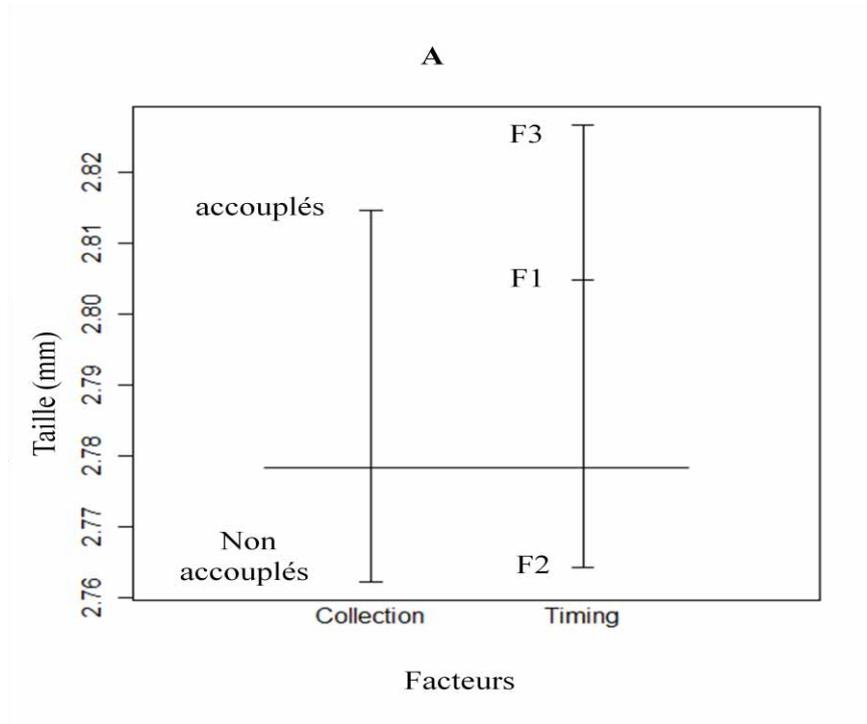


Figure 25 : Comparaison de la taille des mâles accouplés et non accouplés ainsi que des mâles collectés à différents temps donnés au cours de l'essaimage d'*An. coluzzii* à VK7 (A) et d'*An. gambiae* à Soumouso (B).

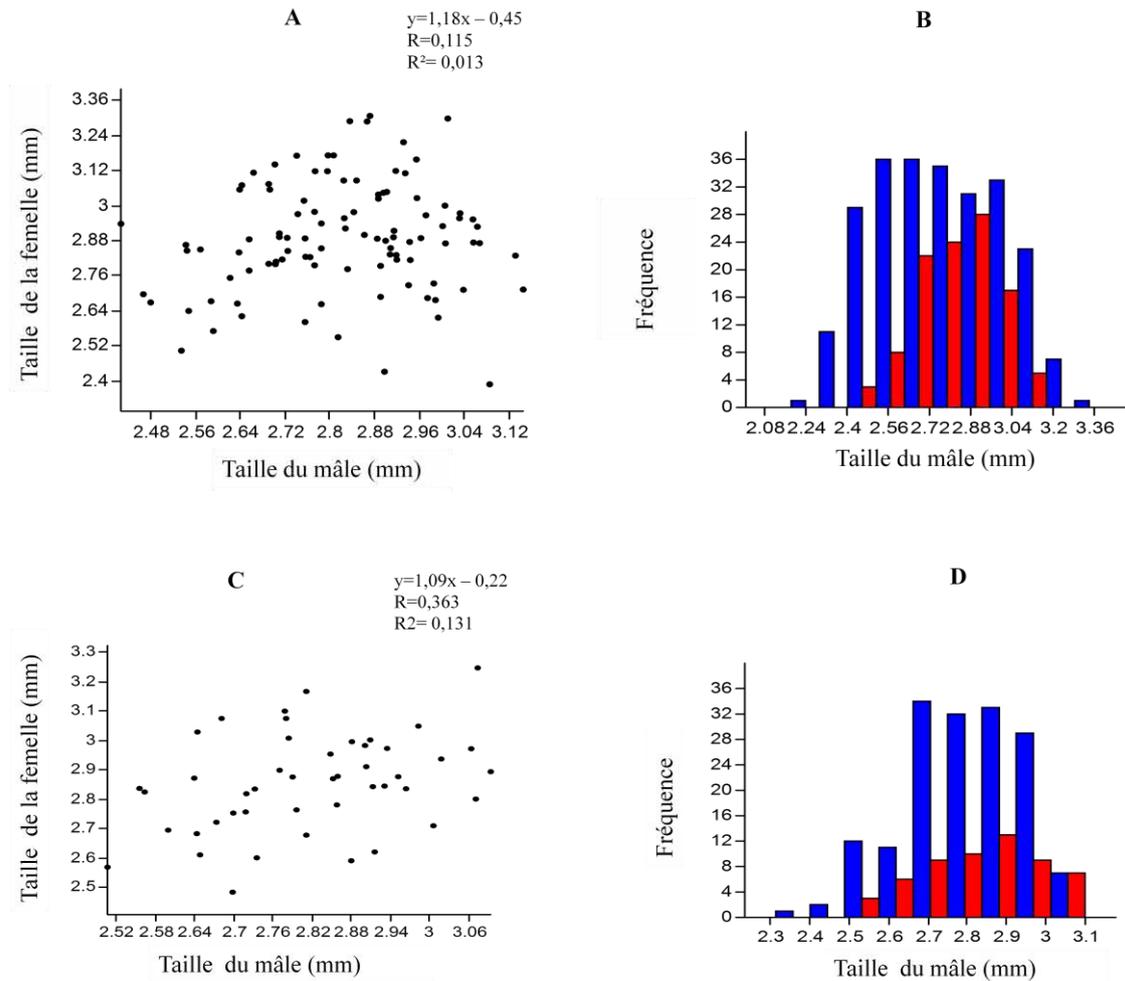


Figure 26 : Comparaison de la taille des mâles et celle des femelles pris en couples et distribution des fréquences de la taille des mâles accouplés (en rouge) et non accouplés (en bleu) chez *An. coluzzii* (VK7) (A, B) et *An. gambiae* (Soumouso) (C, D)

1.3.5. Symétrie des ailes des mâles accouplés et non accouplés dans les essaims

Le test de corrélation de Pearson a montré qu'il y avait une forte corrélation de la taille entre les ailes gauches et droites chez les mâles accouplés et non accouplés d'*An. coluzzii* (accouplés : $r=0,99$, $P<0,0001$, non accouplés : $r=0,98$, $P<0,0001$) collectés dans les essaims (Figure 27) indiquant que les ailes des mâles accouplés étaient aussi symétriques que celles des mâles non accouplés ($t=0,24$, $df=240$, $P=0,8$).

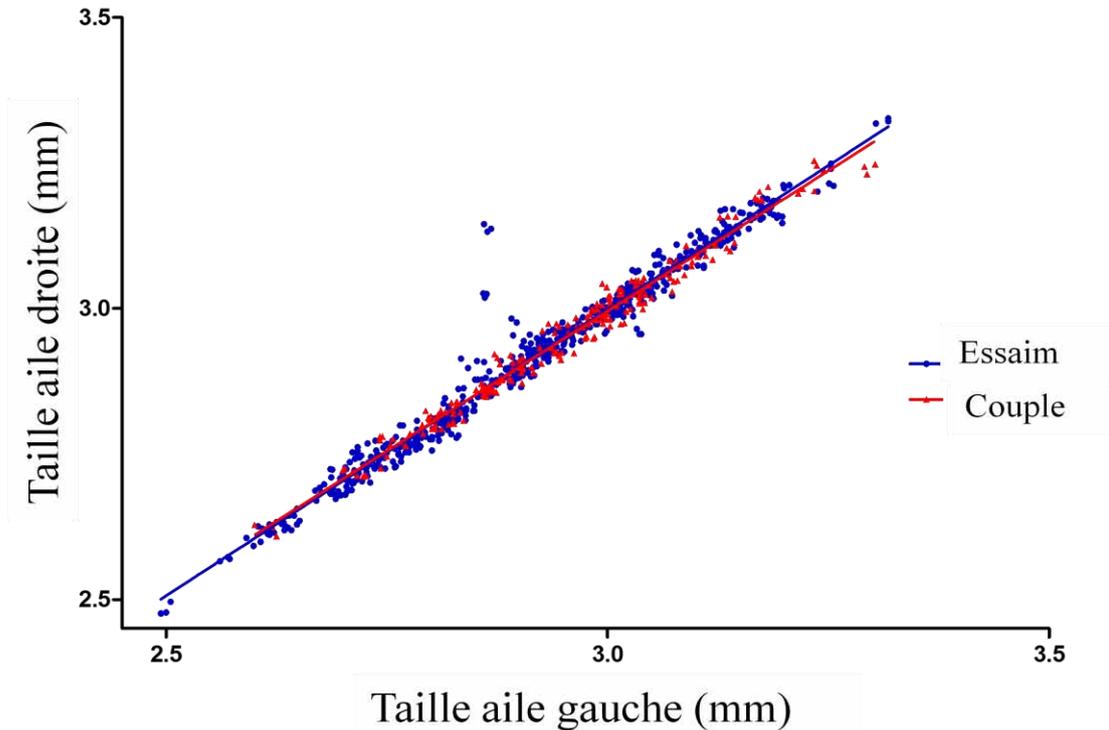


Figure 27 : Corrélation entre les ailes gauches et droites chez les mâles accouplés et non accouplés d'*An. coluzzii*

1.4. Discussion

L'objectif de la présente étude était de décrire les variations énergétiques au cours de l'essaimage et de l'accouplement. Il était aussi question d'évaluer le rôle de la taille et de la symétrie des ailes du mâle dans le succès de la reproduction en milieu naturel.

1.4.1. Variations des réserves énergétiques en fonction du temps et de l'activité des mâles

Nous avons constaté une variation des réserves en sucres totaux et en glycogène mais pas en lipides et en protéines chez les différents groupes de mâles collectés, suggérant que les sucres totaux et glycogène sont les principales réserves utilisées lors des activités de reproduction.

Le rôle des sucres dans la biologie des mâles a été démontré dans quelques études (Müller et Schlein 2006, Gouagna *et al.* 2010). C'est la seule nourriture pour les mâles (Foster, 1995, Gu *et al.* 2011). En outre, le sucre est une source d'énergie nécessaire au vol pour les deux sexes (Nayar et Van Handel, 1971) et pourrait même améliorer leur fécondité (Foster, 1995).

Les mâles sont particulièrement vulnérables au manque de sucre juste après l'émergence des gîtes larvaires (Foster, 1995). Notre étude a montré que les réserves en sucres et en glycogène des mâles au repos collectés le matin étaient supérieures à celles des mâles au repos collectés le soir. Cela reflèterait bien le comportement trophique des espèces *d'An. coluzzii* et *d'An. gambiae*. Dao *et al.* (2008) ont montré grâce à l'utilisation des pièges placés à l'intérieur et à l'extérieur des habitations, que les moustiques s'activent au crépuscule à la recherche soit des sites d'essaimage (reproduction), soit pour la recherche d'un repas de sang et/ou sucré. Après avoir refait le plein d'énergie, ces moustiques recherchent à nouveau les sites de repos le lendemain en fin de nuit. De même, Yuval *et al.* (1994) avaient préalablement montré que la recherche du repas sucré chez *An. freeborni* avait lieu juste après l'heure des essaims, avant de regagner les sites de repos. Ces auteurs ont en effet trouvé que les teneurs en sucres et en glycogène des mâles d'*An. freeborni* collectés le matin étaient supérieures à celle des mâles collectés le soir dans les sites de repos. Ces réserves ainsi acquises assurent les besoins quotidiens notamment l'activité d'essaimage (Yuval, 1992, Yuval *et al.* 1994).

La présente étude suggère que 59% des sucres totaux et 32% de glycogène sont consommés lorsque les moustiques sont au repos et 15,9 % des sucres totaux sont alloués aux activités d'essaimage. Compte tenu du fait que l'essaimage dure ~30 min et que les mâles passent ~660 min au repos (de 06:00 à 17:00 respectivement heure de collecte le matin et du soir dans les sites de repos), les mâles qui essaient consomment proportionnellement 5,9 fois plus d'énergie provenant de sucres que les mâles au repos. Par conséquent les sucres sont extrêmement importants dans la survie du mâle. Des études expérimentales auraient démontré l'incapacité des mâles dépourvus de sucres à féconder des femelles (Stone *et al.* 2009, Gary *et al.* 2009). Huho *et al.* (2007) ont constaté que les réserves en sucres et en glycogène chez des moustiques collectés en milieu naturel étaient nulles comparés aux moustiques élevés au laboratoire. Cela pourrait être dû au fait que les moustiques collectés avaient déjà épuisé leur stock en sucres.

La teneur en protéines dans les différents groupes de mâles collectés au cours du temps ne varie pas indiquant que les protéines, principalement obtenues au stade larvaire (Foster, 1995) joueraient plutôt un rôle structural. Au cours du développement pré-imaginal, les larves se nourrissent dans les gîtes, de différentes matières organiques dégradées par des bactéries et des champignons. Les réserves nutritives accumulées au cours de cette vie larvaire sont essentiellement constituées de protéines et de lipides. Des études sur les besoins nutritionnels ont montré qu'un régime dépourvu de protéines inhiberait le développement larvaire d'*Ae.*

aegypti. De même, la teneur en lipides n'a pas significativement varié entre les différents groupes de moustiques en fonction du temps (matin, soir, essaim) et de l'activité (essaim, repos). Nayar et Van Handel (1971) ont établi que ce sont les sucres qui sont utilisés pour le vol et non les lipides chez *Aedes sollicitans*. Les lipides ne sont pas utilisés pour le vol mais pourraient être métabolisés en glucose et glycogène pour compenser le manque de sucres en situation de stress (Yuval *et al.* 1994).

1.4.2. Budget énergétique des mâles des essaims d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae*

Nos résultats ont démontré que l'essaimage chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* est très coûteux. La moitié des réserves totales en glucides (sucres et glycogène) s'épuise au cours d'une soirée d'essaimage comme l'atteste la variation constatée entre les mâles collectés au début et à la fin de l'essaimage. Ce constat confirme que les glucides constituent le principal combustible utilisé en vol (Nayar et Van Handel, 1971, Briegel *et al.* 2001; Yuval *et al.* 1994 Huho *et al.* 2007). Il faut noter cependant que l'estimation du budget énergétique prend en compte plusieurs facteurs qui pourraient rendre difficile son estimation. Selon Oliva *et al.* (2012) le coût de la reproduction pour un mâle d'*Aedes albopictus* comprend les dépenses liées à la recherche de la femelle, à l'accouplement et le transfert de la semence sans occulter la compétition entre mâles. Papadopoulos *et al.* (2010) par contre ont montré que la recherche de la femelle mouches de fruits serait plus coûteuse que l'accouplement. Cela pourrait même impacter leur survie. Toutefois, ces constats révèlent la nécessité de reconstituer au quotidien les réserves afin d'assurer la survie et les activités de reproduction, conformément à l'observation de Yuval *et al.* (1994).

Dans cette étude, les mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* ont consommé près de la moitié de leurs réserves en glucides au cours de l'essaimage. Cependant *An. gambiae* (Soumouso) a investi environ 6% de plus que *An. coluzzii* (VK7). Cette différence pourrait être liée à la qualité des nutriments des gîtes larvaires (Ng'habi *et al.* 2008) rencontrés sur ces deux sites d'échantillonnage à VK7 et à Soumouso. Foster (1995) a également souligné l'importance du repas sucré pour le mâle et sa variation en fonction des espèces et de leur habitat. L'analyse des réserves des mâles au repos et des mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* collectés sur le même site de Soumouso s'est révélée similaire. Par contre, les réserves en glucides (sucres totaux et glycogène) des mâles nouvellement émergés d'*An. gambiae* (Soumouso) étaient sensiblement plus élevées que ceux des mâles d'*An. coluzzii* (VK7). Ces différences confirment que les variations écologiques pourraient expliquer la

différence en réserves énergétiques constatées chez ces deux espèces collectées sur des sites différents.

1.4.3. Réserves énergétiques des mâles accouplés et non accouplés dans les essaims

Les mâles accouplés n'ont pas plus de réserves énergétiques que les mâles non accouplés, contrairement à toute attente. Cela suggérerait que les réserves énergétiques ne seraient peut-être pas le facteur le plus important dans le succès de l'accouplement bien que le rôle du repas sucré dans l'essaimage ait été bien documenté (Yuval *et al.* 1994, Briegel *et al.* 2001). Les mâles après l'émergence, ont besoin de faire le plein d'énergie le stock d'énergie acquis au stade larvaire en milieu naturel étant rarement suffisant pour assurer les activités de reproduction. Selon Yuval *et al.* (1994), c'est le succès dans la cueillette du nectar qui déterminera la capacité d'un mâle à participer à l'essaimage. D'autres auteurs ont suggéré que les mâles qui participent à l'essaimage auraient les mêmes qualités car en milieu naturel, seuls les individus résistants aux conditions difficiles du stade larvaire émergent (Huho *et al.* 2007). L'essaimage a un coût et il semble qu'un seuil de réserves énergétiques pourrait influencer la participation des mâles aux essaims et par conséquent, la chance pour un mâle de s'accoupler dépendrait du temps passé dans un essaim (Yuval *et al.* 1994).

1.4.4. Taille et symétrie des ailes du mâle

Le succès à l'accouplement de certains insectes est associé à la symétrie alaire. Les mâles symétriques auraient plus de chance d'être 'choisis' par les femelles du fait de leur 'santé' génétique. Par contre, les individus asymétriques se caractériseraient par une forte mortalité, une faible fécondité et une croissance plus lente (McLachlan et Cant, 1995 et des références qui y sont mentionnées). Nos résultats n'ont pas montré de différence de symétrie entre les mâles accouplés et non accouplés. Il existe une forte corrélation entre les ailes gauches et droites des mâles accouplés et non accouplés. Cependant il serait intéressant de développer d'autres méthodes de mesure de la symétrie afin de confirmer cette observation.

Des études ont investigué le rôle de la taille dans la sélection sexuelle. Ces études ont montré que la préférence pour des femelles plus larges aurait une influence génétique sur la descendance (Okanda *et al.* 2002). Les mêmes auteurs ont montré qu'en situation de compétition où des milliers de mâles concourent pour quelques femelles, celles plus larges sont susceptibles d'être inséminées et de pondre plus d'œufs. Cela montre l'avantage de la

grande taille chez les femelles. Cependant, le rôle de la taille dans le succès reproducteur chez les mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* nécessite plus d'attention. Dans les systèmes de reproduction se caractérisant par un regroupement des mâles, la taille joue un rôle important car elle est synonyme de force physique permettant de défendre le territoire (Diabaté *et al.* 2011). Cependant, il reste à savoir si cette règle s'applique aussi aux mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae*. Quel que soit le site de collecte de moustiques (VK7 ou Soumousso), aucune différence de taille des ailes n'a été observée chez les mâles collectés au début, au pic et à la fin de l'essaimage. Cela signifie que la taille des mâles ne jouerait pas un rôle important dans la participation à l'essaimage. Toutefois, il a été établi que les mâles accouplés d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* étaient en moyenne significativement plus grands que les mâles non accouplés. Un constat similaire a été fait chez *An. freeborni* par Yuval *et al.* en 1998, tandis que Charlwood *et al.* (2002) n'ont trouvé aucune différence dans la taille. Nous avons constaté que la taille des mâles accouplés est principalement distribuée autour d'une valeur intermédiaire chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*, suggérant que l'agilité dans le vol pourrait également jouer un rôle important dans le succès d'accouplement. Cela confirme les conclusions de N'ghabi *et al.* (2008), qui ont montré que les mâles ayant une taille intermédiaire avaient plus de succès à l'accouplement comparativement aux petits et grands mâles. Peckarsky *et al.* (2002) ont aussi montré que les mâles d'éphémères (*Baetis bicaudatus*) ayant une taille intermédiaire pourraient être avantagés dans l'accouplement en raison de leur agilité. Nous avons en outre observé une faible corrélation entre la taille des mâles et celle des femelles pris en couples, suggérant que la distribution de la taille des moustiques dans les couples n'est pas homogène. Si la taille intermédiaire est avantageuse, il n'existerait cependant pas de choix délibéré entre les moustiques de sorte que les petits mâles s'accouplent avec les petites femelles et les grands mâles aux grandes femelles dans notre étude. Cela est un aspect important dans la production en masse au laboratoire dans les programmes de lutte génétique nécessitant des lâchers massifs de mâles.

1.5. Conclusion partielle

La présente étude a montré que l'essaimage consomme une proportion significative des réserves énergétiques des mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae*. Les activités d'essaimage ont pour ressource principale les réserves de sucres et de glycogène. Même si nous n'avons pas pu trouver de différence significative entre les réserves énergétiques des mâles accouplés et non accouplés, la question doit être approfondie avec un meilleur protocole

d'échantillonnage. Les mâles accouplés chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* collectés dans deux sites différents, étaient en moyenne significativement plus grands que les mâles non accouplés, toutefois la taille de ces mâles accouplés se situait autour d'une valeur centrale intermédiaire, suggérant que l'agilité dans le vol pourrait également jouer un rôle important dans le succès d'accouplement. Il serait alors important de développer un régime alimentaire riche en glucides pour rendre les mâles de laboratoire assez compétitifs lors des lâchers. Ces mâles stériles relâchés devraient être également capables de pouvoir survivre, reprendre du sucre naturellement et assurer de nouveaux essaimages de pair avec une longévité et une activité comparable à celle des mâles sauvages.

PARTIE 2 : Evaluation de l'impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d'*Anopheles coluzzii*

2.1. Introduction

La technique de l'insecte stérile (TIS) (Catteruccia *et al.* 2009, Cohuet *et al.* 2004, Helinski *et al.* 2006, Klassen, 2009) comme méthode génétique de lutte antivectorielle est confrontée à de nombreuses difficultés qui ont conduit les premières tentatives à des résultats mitigés (Weidhaas *et al.* 1962, Reisen *et al.* 1982). La méconnaissance du comportement reproductif des espèces ciblées reste une zone d'ombre importante à laquelle s'ajoutent les besoins d'améliorer les techniques de production afin de limiter la perte de succès reproducteur des individus stérilisés par irradiation et d'améliorer le rendement de la production des moustiques. En effet, ce rendement est d'une importance capitale car il influence directement le coût de la méthode au plan opérationnel. Pour produire des moustiques performants, il est important de prendre en compte certains paramètres biologiques comme la durée du développement larvaire, la taille des adultes et leur longévité (Briegel, 1990, Lyimo et Takken, 1993).

Le présent travail vise à évaluer différents régimes alimentaires pour *An. coluzzii* afin d'obtenir une production optimale de moustiques tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Plus spécifiquement, il s'agissait de tester si la nature de ces diètes, leur concentration dans le milieu (quantité de nourriture), et la densité larvaire avaient un impact sur la durée de développement pré-imaginal, le taux d'émergence global, et la taille des moustiques à l'émergence.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Préparation des diètes

Quatre diètes différentes ont été testées au cours de cette étude. La première diète (diète 1) est un mélange de 5 g de poudre de thon (PT), de 5g de poudre de foie de bœuf (PFB) et de 4,6 g du complexe de vitamines (CV). La diète 2 est aussi un mélange composé des mêmes éléments de la diète 1 auxquels était ajouté 4,6 g de broyat de levure (BL). Les diètes 3 et 4 étaient toutes les deux des aliments d'élevage de poissons utilisés en insectarium pour nourrir les larves de moustiques : Koi food[®] et TetraMin[®] Baby respectivement. Pour chacune de ces

diètes, des suspensions ont été réalisées à quatre concentrations différentes : 0,5%, 1%, 2% et 3%. Pour ce faire, les quantités de poudres correspondantes ont été prélevées et pesées puis diluées dans 250 ml d'eau distillée chacune (Tableau II). Les suspensions ont par la suite été homogénéisées à l'aide d'un agitateur magnétique 10 min toutes les heures pendant 7 h. Des aliquotes de 1,5 ml ont été ensuite réalisées à partir de chacune des suspensions mères et conservées au congélateur à -20°C jusqu'à utilisation. Pour assurer l'homogénéité des aliquotes, l'opération a été réalisée en prenant soin de prélever et de distribuer 500µl de suspension à la fois pour tous les tubes puis une seconde fois pour tous puis une troisième fois (Figure 28).

Tableau II : Masse des diètes à prélever pour un volume de 250 ml

Concentration (m/v)	Diète 1 (g) (PT+PFB+CV)	Diète 2 (g) (PT+PFB+CV+BL)	Diète 3 (g) (Koi Food)	Diète 4 (g) (TetraMin® Baby)
C1 = 0,5 %	1,25	1,25	1,25	1,25
C2 = 1 %	2,5	2,5	2,5	2,5
C3 = 2 %	5	5	5	5
C4 = 3 %	7,5	7,5	7,5	7,5

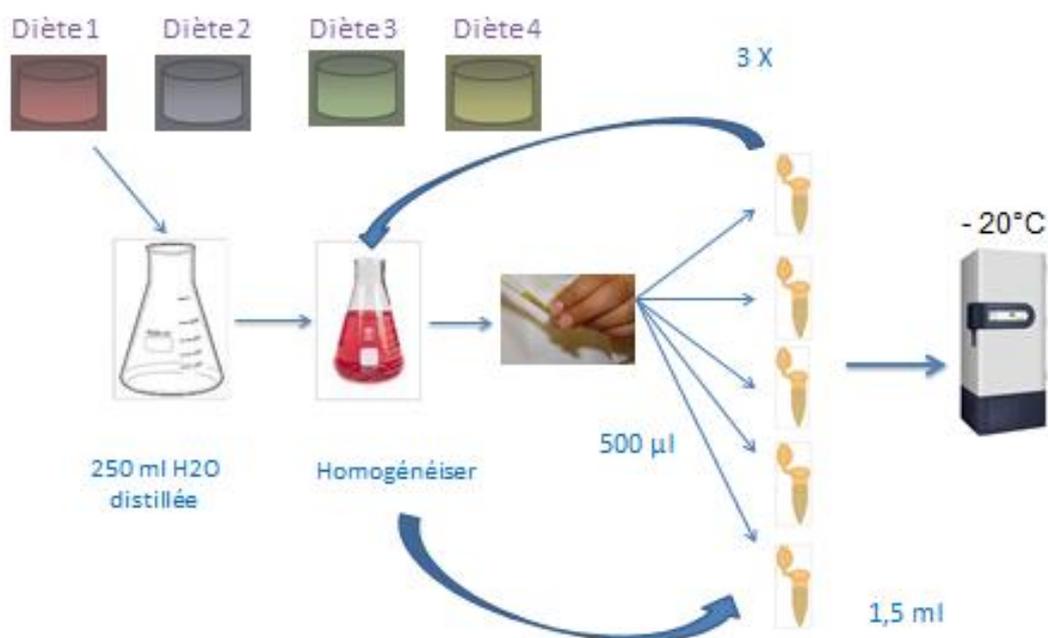


Figure 28 : Procédure de préparation des diètes

2.2.2. Exposition des larves aux différents traitements

Tous les tests effectués au cours de cette étude l'ont été sur des moustiques provenant d'œufs d'*An. coluzzii* obtenus de l'insectarium de l'IRSS/Centre Muraz suivant le protocole décrit dans le chapitre Méthodologie générale (cf. chapitre 2, 2.3.2 a).

Les œufs d'*An. coluzzii* ont été collectés au premier jour de l'expérience et mis en éclosion synchronisée à faible densité dans des bacs contenant chacun 1L d'eau distillée. La date et l'heure de l'éclosion ont été notées. Nous avons utilisé des larves de stade 1 (L1) âgées d'un maximum de 4h. Le nombre de larves correspondant à chaque densité larvaire a été prélevé puis transféré dans un bêcher de 50 ml à l'aide d'une pipette. Le volume d'eau distillée dans le bêcher a été ensuite complété à 32 ml et l'ensemble du contenu transvasé délicatement dans une boîte de pétri (9 cm de diamètre). Ainsi, pour chacune des 4 concentrations (0,5%, 1%, 2% et 3%) de chaque diète, 4 densités larvaires (D) différentes ont été testées : D1=16 L1, D2=32 L1, D3=64 L1 et D4=128 L1. Quatre répliques simultanées ont été réalisées pour chacune des combinaisons diète x concentration x densités larvaires. Les boîtes de pétri ont alors été disposées sur une étagère où elles étaient réarrangées chaque jour afin d'éviter un effet position. Pour nourrir les larves, 640 µl de suspension des différentes diètes ont été prélevés à partir des aliquotes réalisées précédemment et distribuées de manière équitable dans la boîte de pétri correspondante. Les larves ont été nourries chaque jour à la même heure, jusqu'à la nymphose de la dernière larve dans la boîte de pétri. La collecte de nymphes a été réalisée 3 fois par jour: le matin à 8 heures, à midi et dans l'après-midi à 16 heures. Les nymphes formées ont été transférées dans des gobelets recouverts d'un filet moustiquaire pour l'émergence. La date ainsi que l'heure de leur formation ont été notées. De même, les nymphes étaient surveillées pour l'émergence; la date, l'heure et le sexe de chaque moustique étant notés (Figure 29). Les moustiques nouvellement émergés ont été anesthésiés, séparés par sexe et conservés dans des cryotubes à -80°C pour analyses supplémentaires.

2.2.3. Mesure des traits d'histoire de vie

Trois paramètres ont été mesurés : le temps de développement pré-imaginal (durée de développement de la larve à l'adulte); le taux d'émergence (proportion des larves ayant atteint le stade adulte) et la taille des ailes de 35 adultes par traitements pris au hasard parmi les émergents. La taille des ailes est un proxy de la taille des adultes (Briegel, 1990) et a été mesurée comme indiqué dans la Méthodologie générale (cf. chapitre 2, 2.3.2.b).

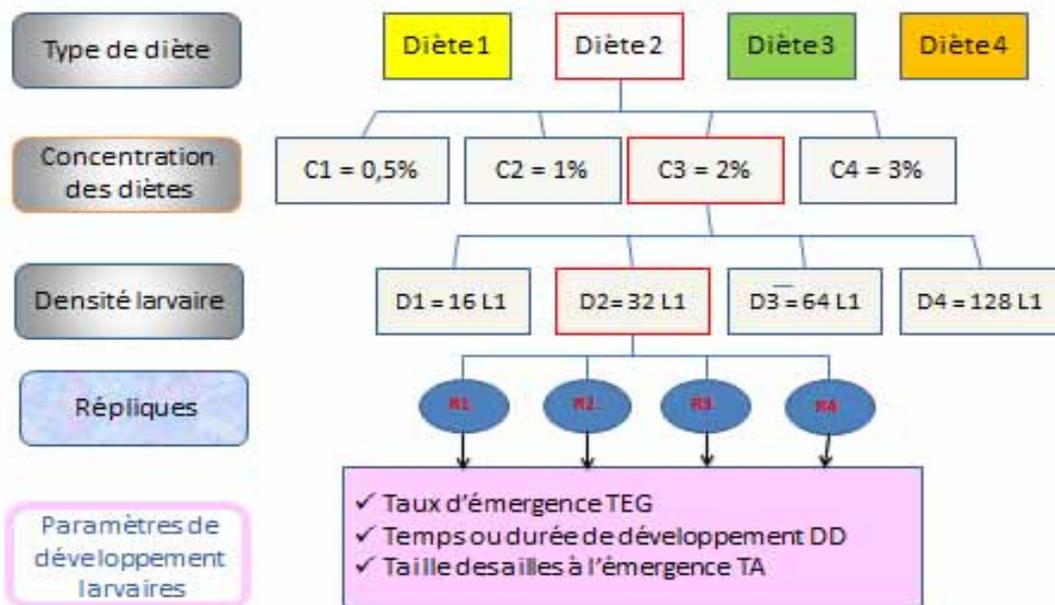
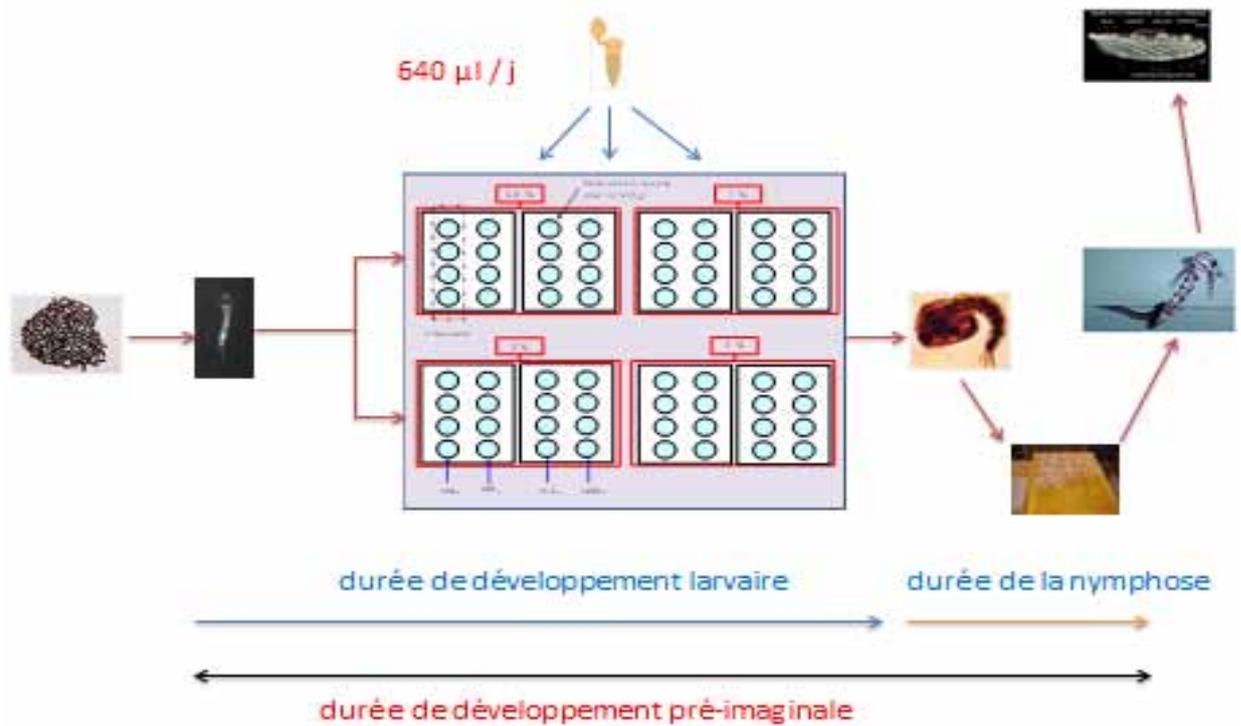


Figure 29 : Schémas du protocole expérimental

Les différents paramètres de développements pré-imaginaux ont été calculés suivant les formules ci-dessous:

Durée de développement pré-imaginaire (DD) :

$$DD = (\text{date d'émergence} + \text{heure d'émergence}) - (\text{date d'éclosion} + \text{heure d'éclosion})$$

Taux d'émergence global (TEG) :

TEG = nombre d'adultes à l'émergence / nombre initial de larve de stade 1

2.3. Résultats

2.3.1. Impact du régime alimentaire sur la durée de développement larvaire

Les données sur le temps de développement larvaire ne suivent pas une distribution normale ($P < 0,05$, test de Kolmogorov Smirnov) (Figure 30). Nous avons donc procédé à une transformation logarithmique des moyennes afin de pouvoir les comparer avec une analyse des variances (ANOVA). En moyenne, toutes variables confondues, la durée de développement larvaire était de 9,65 jours et aucune différence significative n'a été observée entre mâles et femelles ($P > 0,05$).

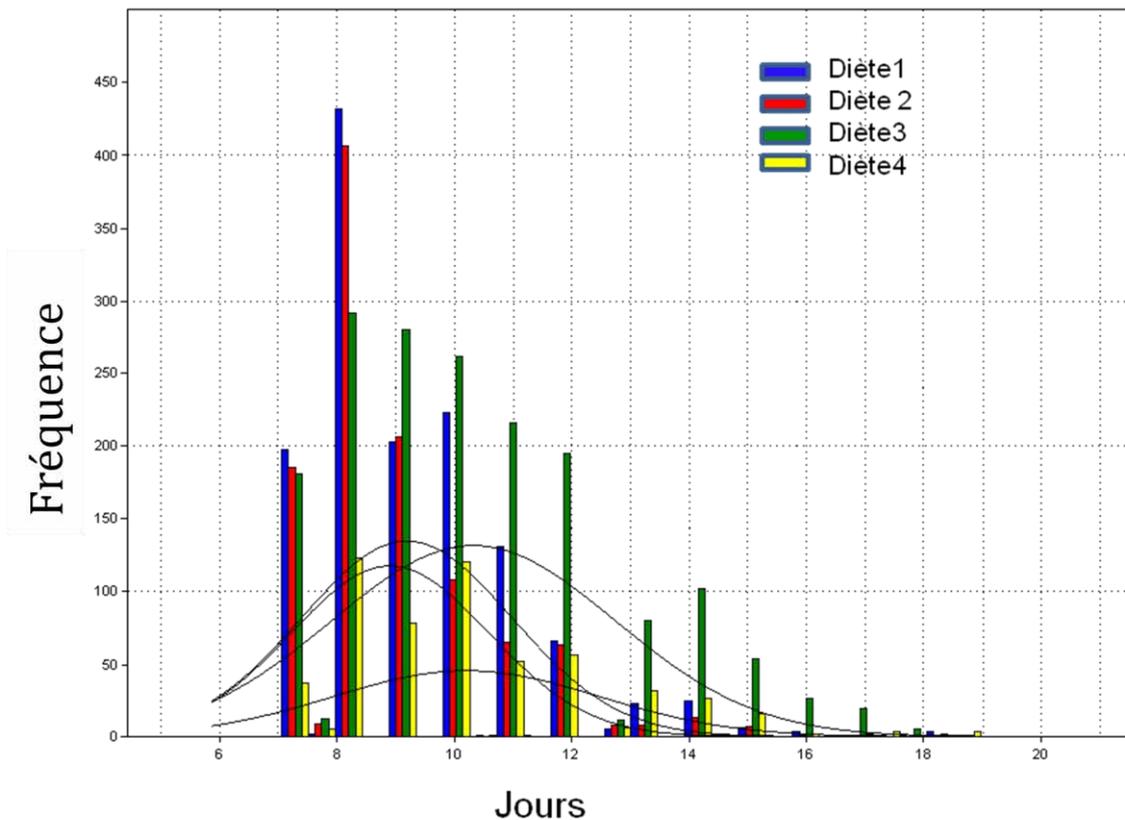


Figure 30 : Fréquence de distribution du temps de développement larvaire

La Figure 31 montre la moyenne de temps de développement des mâles et femelles par type de diète. L'ANOVA a montré que les différents types de diètes induisaient des temps de développement différents (Figure 31, ddl=3, $F=283,4$, $P < 0,0001$). Il en était de même pour les autres variables concentration de diète et densité larvaire. Les interactions entre ces

différentes variables sont également significatives (Tableau III). Les plus faibles temps de développement ont été observés avec les diètes 1 et 2 (9,18 jours et 8,89 jours), la diète 3 ayant le temps le plus élevé. Toutefois, une plus grande mortalité larvaire a été observée avec toutes les diètes en comparaison de la diète 3.

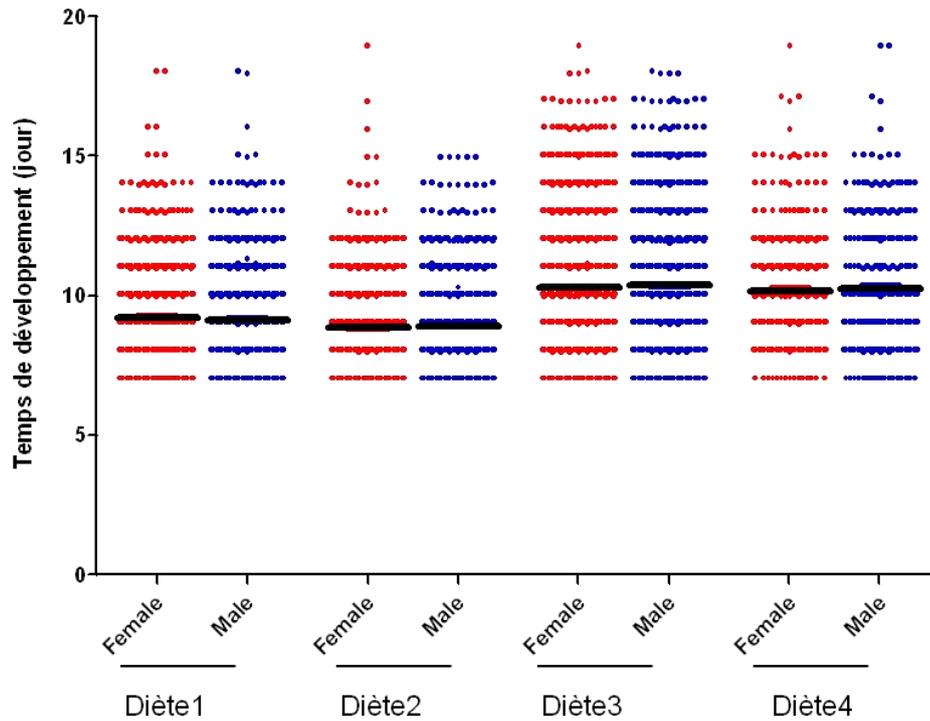


Figure 31 : Temps de développement larvaire par sexe et par type de diète

Tableau III : Impact des différentes variables sur le temps de développement larvaire

Source	Ddl	F	P
Diète	3	283,4	<0,0001 ***
Concentration	3	411,2	<0,0001 ***
Densité	3	840,7	<0,0001 ***
Diète x Concentration	9	9,4	<0,0001 ***
Diète x Densité	9	51,9	<0,0001 ***
Concentration x Densité	9	33,9	<0,0001 ***
Diète x Concentration x Densité	24	4,4	<0,0001 ***

* indique le degré de significativité

Dans tous les cas, la durée de développement larvaire diminue avec la concentration de nourriture mais augmente avec l'augmentation de la densité larvaire (Figure 32).

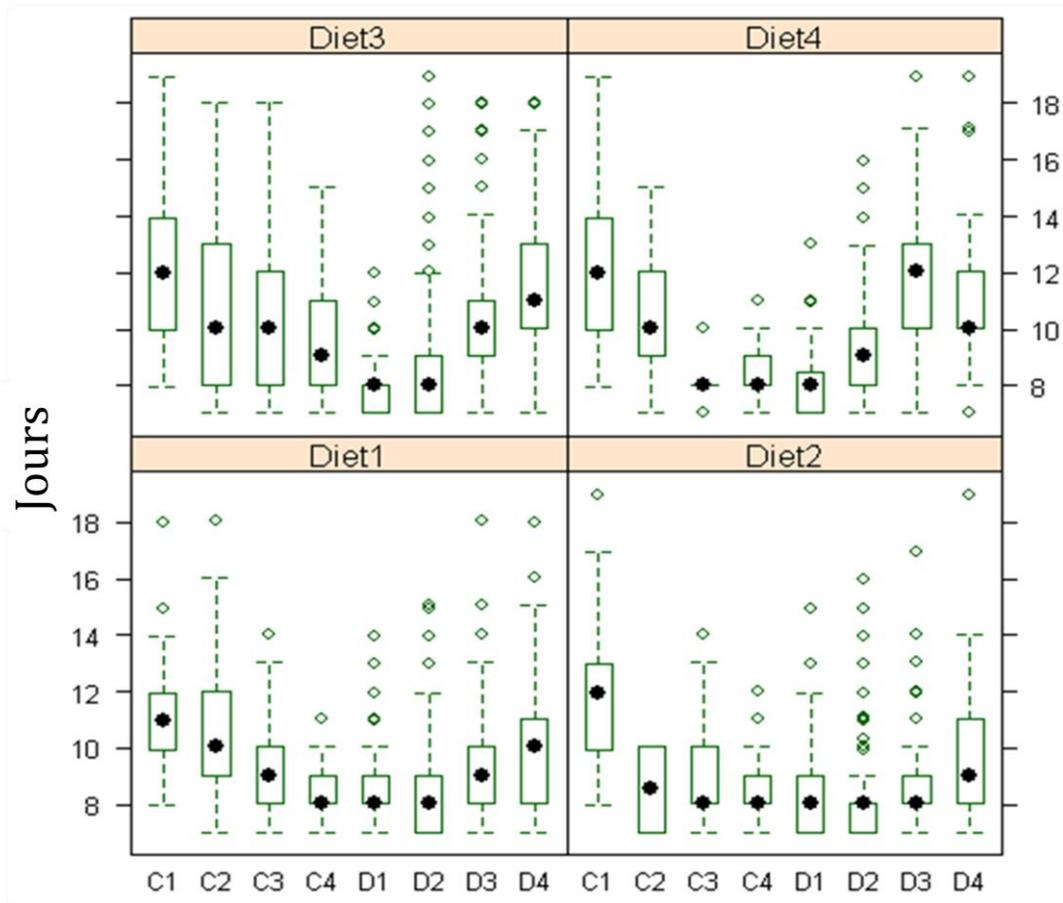


Figure 32 : Impact de la quantité de nourriture et de la densité larvaire sur le temps de développement par type de diète. C1-C4 représentent les 4 concentrations de diètes utilisées dans les tests tandis que D1-D4 se réfèrent aux 4 densités larvaires testées.

2.3.2. Impact du régime alimentaire sur le taux d'émergence

Au total 4 685 moustiques adultes ont été collectés sur l'ensemble des 4 diètes testées soit un taux d'émergence global de 30,5% (4 685/15 360). Une grande variation du taux d'émergence des adultes a été observée entre diètes. Les diètes 1, 2 et 3 reçues de l'AIEA ont toutes donné un rendement meilleur à celui de la diète 4 (TetraMin[®] Baby) utilisée en routine à l'insectarium. La diète 3 a donné le meilleur rendement soit 3,07 fois celui de la diète 4 (Figure 33). Le taux d'émergence des mâles et des femelles était similaire (2 263 mâles et 2 422 femelles, $P=0,2$).

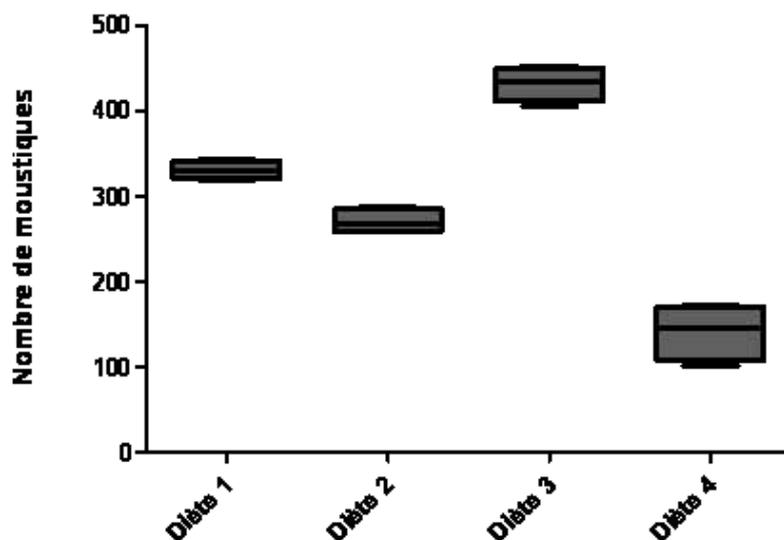


Figure 33 : Variation du taux d'émergence en fonction du type de diète

L'effet de la diète, de la concentration et de la densité larvaire a été évalué sur le taux d'émergence. L'analyse de régression logistique a montré un impact significatif de la variable «Diète» sur le taux d'émergence ($F_{3, 249}=25,9$; $P<0,0001$). Il en était de même pour la «concentration» ($F_{3, 249}=47,6$, $P<0,0001$) et la «Densité» ($F_{3, 249}=40,3$, $P<0,0001$). Une interaction significative entre les différentes variables a montré que le taux d'émergence est fortement modulé par l'interaction entre ces variables Diète x Concentration x Densité ($P<0,0001$) (Tableau IV).

L'analyse de l'impact spécifique du type de diète et de la concentration en fonction des densités a montré qu'à faible densité (Densité 1 ou D1), le taux d'émergence a varié faiblement avec la concentration de la diète. De même, une variation du taux d'émergence en fonction de la qualité des diètes a été globalement observée, mais cette différence était plus prononcée avec les fortes densités (Figure 34).

Tableau IV : Impact des différentes variables sur le taux d'émergence mesuré par une analyse de régression logistique (GLM)

Source	Ddl	F	P
Diète	3	25,9	<0,0001***
Concentration	3	47,6	<0,0001***
Densité	3	40,3	<0,0001***
Diète x Concentration	9	30,6	<0,0001***
Diète x Densité	9	1,8	0,074
Concentration x Densité	9	4,5	<0,0001***
Diète x Concentration x Densité	27	2,8	<0,0001***

* indique le degré de significativité et les valeurs ne portant pas le signe * indiquent une comparaison non significative

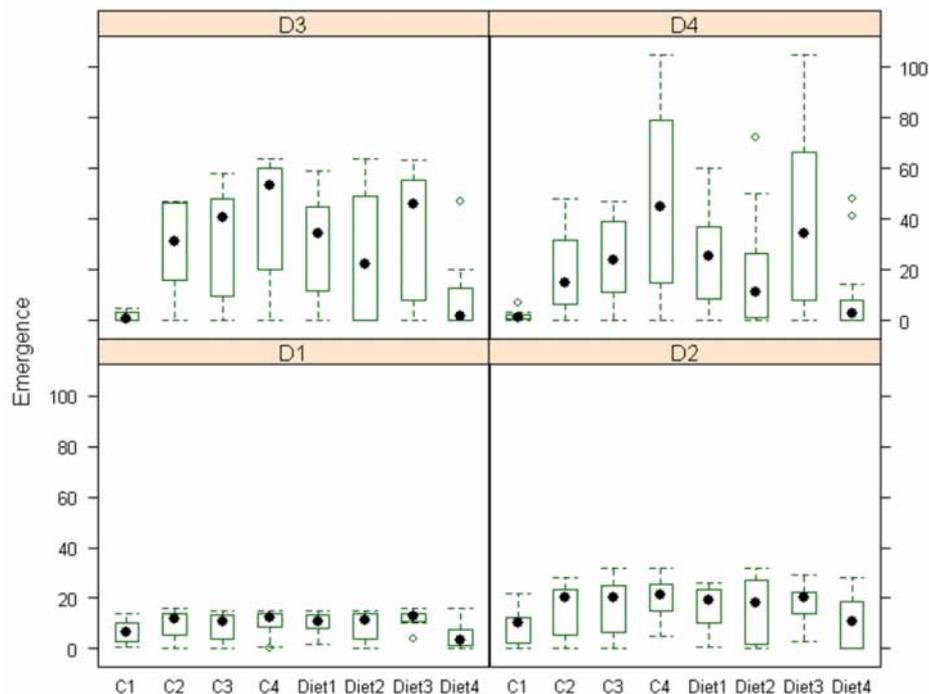


Figure 34 : Impact de la quantité de nourriture et du type de diète sur le taux d'émergence en fonction de la densité larvaire. C1-C4 représentent les 4 concentrations de diètes utilisées dans les tests tandis que D1-D4 se réfèrent aux 4 densités larvaires testées.

2.3.3. Impact du régime alimentaire sur la taille des ailes

Une forte variation de la taille des ailes en fonction du type de diète, de la concentration de nourriture fournie et de la densité larvaire a été observée (Tableau V). De même, une interaction significative de ces variables deux à deux ou de toutes les trois variables à moduler

la taille des ailes a été observée (Tableau V). A faible concentration de nourriture, la taille des ailes est réduite et cette taille augmente avec la quantité de nourriture offerte. Quant à la densité larvaire en revanche, elle montre un impact inverse (Figure 35).

Tableau V : Impact des différentes variables sur la taille des ailes

Source	Ddl	F	P
Diète	3	34,5	<0,0001***
Concentration	3	143,9	<0,0001***
Densité	3	611,5	<0,0001***
Diète x Concentration	9	5,3	<0,0001***
Diète x Densité	9	6,3	<0,0001***
Concentration x Densité	9	10,7	<0,0001***
Diète x Concentration x Densité	22	3,5	<0,0001***

* indique le degré de significativité

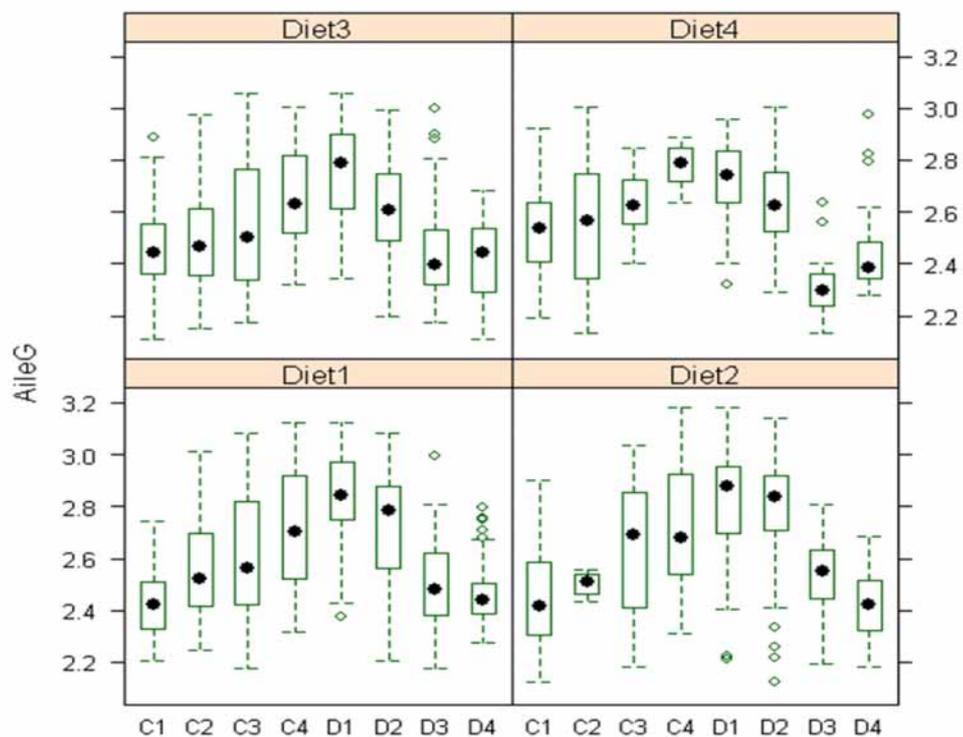


Figure 35 : Impact de la quantité de nourriture et de la densité larvaire sur la taille des ailes en fonction du type de diète. C1-C4 représentent les 4 concentrations de diètes utilisées dans les tests tandis que D1-D4 se réfèrent aux 4 densités larvaires testées

2.4. Discussion

2.4.1. Impact du régime alimentaire sur le temps de développement larvaire

Les résultats obtenus ont montré que la durée de développement pré-imaginal des moustiques était indépendante du sexe, contrairement aux observations faites chez *An. arabiensis* (Gilles *et al.* 2011). En général, les mâles ont un temps de développement larvaire relativement plus court que celui des femelles comme cela a été observé pour les populations naturelles d'*An. coluzzii* sur le terrain (Diabaté *et al.* 2008), mais l'interaction multiple de plusieurs facteurs combinés dans l'étude a dû masquer cette différence. Par contre, il a été observé dans cette étude que, chacune des variables diètes, concentration de la diète et densité larvaire exerce, individuellement et par le biais d'interactions avec les autres variables, une influence significative sur le temps de développement pré-imaginal des deux sexes. Des études semblables avaient déjà montré que lorsque des larves de moustiques se développent dans un milieu à ressources alimentaires limitées, la vitesse de développement, le taux de survie et la taille étaient aussi réduits (Reisen, 1975, Bellows, 1981, Briegel, 2003).

L'impact spécifique des différentes quantités de nourriture (concentration de diète) suggère que l'abondance de la nourriture accélère le développement larvaire. Par contre, l'évaluation de l'impact de la densité larvaire a montré que l'augmentation du nombre de larves du milieu allongeait le temps de développement, suggérant un ralentissement du développement larvaire du fait de la compétition des larves pour la nourriture (Briegel, 2003, Juliano, 2007). Ces résultats sont semblables à des observations antérieures démontrant qu'une température basse, une faible disponibilité en nutriments et une densité larvaire élevée induisaient un temps de développement plus long (Briegel, 1990, Lyimo *et al.* 1992, Gimnig *et al.* 2002). La signification pratique d'une telle différence entre diètes (type et concentration) et densités larvaires est très importante car un développement larvaire accéléré réduirait les coûts de production dans la chaîne de production de masse.

2.4.2. Impact du régime alimentaire sur le taux d'émergence

L'évaluation de l'impact du régime alimentaire sur le taux d'émergence a montré que le sexe des larves (donc des pupes) n'avait pas d'influence significative sur la probabilité d'émergence des moustiques. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus sur *An. arabiensis* n'indiquant aucune différence significative entre les taux d'émergence des pupes mâles et femelles (Gilles *et al.* 2011). Les résultats observés ici sont donc globalement extrapolables

aux mâles d'*An. coluzzii*. Par contre, la qualité et la quantité de la nourriture avec laquelle les larves ont été nourries et la densité de la population larvaire ont influé de manière importante sur le taux d'émergence des moustiques. Ces observations sont corroborées par d'autres études qui ont montré que la limitation en ressources alimentaires du milieu de développement larvaire induisait également une limitation du taux de survie larvaire et par conséquent, une limitation du taux d'émergence (Reisen, 1975, Bellows, 1981, Briegel, 2003).

L'impact spécifique de la concentration des diètes en fonction des densités a indiqué que l'influence positive de la concentration des diètes sur le taux d'émergence bien que faible au départ, augmente significativement avec la densité larvaire. Ceci pourrait s'expliquer par les besoins nutritionnels des larves. En effet, à faible densité, le besoin nutritif des larves est vite saturé au point qu'une augmentation graduelle de la concentration de nourritures (C1, C2, C3 et C4) n'a pas un impact très visible sur le taux d'émergence. Cependant lorsque la densité larvaire augmente, la quantité de nourriture exigée est plus grande et les meilleurs rendements de développement larvaire sont obtenus avec les concentrations de diètes les plus élevées. Ces résultats sont similaires à ceux observés sur *An. arabiensis* dans des conditions semblables (Gilles *et al.* 2011). Ils confirment l'hypothèse selon laquelle, les variations observées sur le développement larvaire seraient plus liées à la quantité d'aliment que peut absorber une larve plutôt qu'à la concentration alimentaire en soi du milieu. Il en est de même de la variation du taux d'émergence en fonction de la qualité de la diète. Cependant, c'est la qualité nutritionnelle des aliments et non leur disponibilité qui va être révélée avec l'augmentation de la densité larvaire; les diètes les plus riches permettant le développement d'un plus grand nombre de larves, même en quantité relativement peu élevée.

2.4.3. Impact du régime alimentaire sur la taille des ailes

Les résultats observés ont montré que la taille des ailes varie fortement en fonction du type de diète, de la concentration de nourriture fournie et de la densité larvaire. Ils ont montré également l'existence d'une modulation significative par des interactions de ces variables deux à deux ou de toutes les trois. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Gilles *et al.* (2011) qui ont démontré que la densité larvaire et la quantité de nourriture disponible pour les larves d'*An. arabiensis*, avaient une incidence sensible sur la taille des ailes des moustiques à l'émergence (Gilles *et al.* 2011).

L'analyse de l'impact spécifique de la concentration de diète et de la densité larvaire suggère que la taille des ailes augmente avec la quantité de nourriture disponible, tandis

qu'elle diminue avec l'augmentation de la densité larvaire. La taille des ailes étant un index de la taille corporelle des moustiques (Briegel, 1990, Fernandes et Briegel, 2005), ces observations peuvent s'expliquer par l'existence d'une compétition entre les larves pour la nourriture (Briegel, 2003, Juliano, 2007). De ce fait, une plus grande disponibilité d'aliments permet aux larves de se nourrir suffisamment et donc de produire des adultes de plus grandes tailles à l'émergence. Cela a été observé avec la variation de la concentration de diète. A l'inverse, une augmentation de la population larvaire entraîne une diminution de la quantité de nourriture disponible pour chaque larve et de ce fait, a un impact négatif sur la taille des moustiques. De plus une densité larvaire élevée induirait, indépendamment de la quantité de la nourriture disponible, un stress lors du développement et pourrait conduire à un cannibalisme pour réguler le niveau de la population.

Ces résultats sont intéressants dans la mesure où les moustiques mâles de plus grandes tailles ne sont pas forcément les plus compétitifs pour l'insémination des femelles. Or cette compétitivité sexuelle est l'élément majeur des mâles pour un usage en lutte génétique. En effet, il a été prouvé que les mâles d'*An. coluzzii* les plus compétitifs sexuellement, sont ceux qui ont une taille modérée (Ng'habi *et al.* 2008), ceci étant corroboré par les résultats obtenus au cours de nos travaux (cf. Partie 1). Ainsi, les densités larvaires modérément élevées restent intéressantes du moment où les moustiques adultes qui émergent gardent une taille moyenne. En plus avec un type de diète adéquat et une concentration de diète élevée, il est possible comme démontré plus haut d'obtenir un temps de développement et un taux de d'émergence optimal tout en gardant au niveau des moustiques adultes, une taille relativement modérée.

2.5. Conclusion partielle

L'évaluation de l'impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d'*An. coluzzii* a conduit aux résultats suivants: (i) La qualité de la nourriture avec laquelle les larves sont nourries a une influence significative et sensible sur le taux d'émergence, le temps de développement larvaire et la taille des adultes à l'émergence.(ii) Une augmentation de la quantité de nourriture dans le milieu de développement larvaire tend à optimiser les paramètres de développement des larves c'est-à-dire à augmenter le taux d'émergence, à diminuer le temps de développement et à augmenter la taille des adultes à l'émergence. (iii) Par contre, une augmentation de la densité larvaire du milieu tend à produire un effet inverse sauf si elle est associée à une augmentation concomitante de la quantité de nourriture disponible dans le milieu. (iv) Il existe d'importantes interactions entre

chacune de ces variables de sorte que l'obtention d'un développement optimisé des larves n'est pas forcément la résultante des valeurs extrêmes des variables du milieu mais plutôt celles de valeurs modérément élevées.

Des 4 diètes testées, la diète 2 (composée de poudre de thon, de poudre de foie de bovin, de levure et de complexe de vitamines) semble se dégager du lot et serait le régime idéal associant les meilleurs facteurs d'un développement optimisé pour l'élevage d'*An. coluzzii*. Pour cela, les mâles obtenus doivent être suffisamment compétitifs par rapport aux mâles sauvages pour l'insémination des femelles. Aussi, des études supplémentaires seront-elles nécessaires pour évaluer la longévité et la compétitivité sexuelle des mâles issus des meilleurs régimes alimentaires (type et concentration de diète) que nous avons observés tenant compte d'autres paramètres comme la densité larvaire, afin d'en déterminer le plus efficient. L'utilisation du meilleur régime pour une production de masse permettrait de juger de son efficacité réelle au plan opérationnel.

Les résultats de cette étude seront présentés dans l'article :

Epopa NPS, **Maïga H**, Hien FS, Dabiré KR, R Lees, Gilles J, Baldet T, Tripet F, GA Ouédraogo, and. Diabaté A. Assessment of the developmental success of *Anopheles coluzzii* larvae under different nutrient regimes: effects of diet quality, food amount and larval density. (En préparation)

PARTIE 3 : Standardisation de l'élevage en masse d'anophèles au laboratoire (du traitement des œufs à l'obtention des adultes)

3.1. Introduction

Le succès de la TIS repose principalement sur les lâchers successifs d'un grand nombre de mâles compétitifs dans la zone ciblée (Dame *et al.* 1981). Pour obtenir de grandes quantités de mâles de moustiques, le développement d'équipements et de protocoles standards pour l'élevage de masse est impératif (Benedict *et al.* 2009b) permettant une production de masse à faible coût. Suite à la demande de plusieurs Etats Membres de soutien technique à la mise en place de programme de suppression à l'aide de la TIS, le laboratoire de contrôle des vecteurs (IPLC) de la Division mixte FAO/AIEA a initié en 2006 le développement d'un 'package TIS' comprenant les outils nécessaires pour l'élevage de masse, la stérilisation et le contrôle qualité. C'est le cas des projets d'étude de faisabilité de la TIS pour lutter contre les vecteurs *An. arabiensis*, vecteur principal du paludisme, au Soudan et en Afrique du Sud et également contre *Ae. albopictus*, vecteur d'arboviroses (Dengue, Chickungunya) à l'île de la Réunion et à l'île Maurice.

A cet effet, l'IPCL a conçu un système d'élevage de masse pour les larves et pupes (Balestrino *et al.* 2012), une diète (nourriture) pour les larves (Gilles *et al.* 2011, Damiens *et al.* 2012), un séparateur de pupes et de larves (Balestrino *et al.* 2011) et des cages de production de masse (Balestrino *et al.* 2014). Ces équipements sont testés en ce moment et continuellement adaptés de manière à optimiser la production de masse (quantité) et l'efficacité des moustiques sur le terrain (qualité).

Le développement d'un outil de gestion d'un grand nombre d'œufs produits à partir des cages de production de masse est une étape cruciale dans la chaîne de production de masse. Des méthodes volumétriques en production de masse (Dame *et al.* 1978, Bailey *et al.* 1979, Khan *et al.* 2013) et d'analyses des photographies d'œufs (Mains *et al.* 2008, Mollahosseini *et al.* 2012) ont déjà été développées pour quantifier les œufs de moustiques. Cependant, le comptage manuel longtemps considéré comme 'gold standard' pour quantifier les œufs de moustiques en petits nombres est fastidieux (Dembo *et al.* 2014) et irréalisable en production de masse. Par contre l'estimation des œufs à partir de l'analyse des images (Mollahosseini *et*

al. 2012, Dembo *et al.* 2014) pourrait être rapide, mais ne permet pas de distribuer la même quantité d'œufs par plateau d'élevage.

Le pesage d'œufs nécessite un séchage préalable car la manipulation d'œufs frais collants est peu ou pas pratique (khan *et al.* 2013). Des études préalables sur différentes espèces d'anophèles à savoir *An. albimanus* (Dame *et al.* 1974, 1978), *An. quadrimaculatus* (Bailey *et al.* 1979), *An. stephensi* (Tubergen *et al.* 1978) et plus récemment *An. arabiensis* (Khan *et al.* 2013) ont montré que le séchage n'aurait aucun effet sur le taux d'éclosion à court terme. Toutefois, l'effet du séchage sur d'autres traits d'histoire de vie susceptibles d'impacter la compétitivité des mâles qui en résultent n'a pas encore été étudié.

Le but de la présente étude était donc de développer une méthode standard de quantification de masse d'œufs secs et d'évaluer l'effet du séchage et de la pesée sur le taux d'éclosion ainsi que sur les traits d'histoire de vie tels que le taux de pupaison, la proportion d'adultes émergents, leur taille, leur longévité, ainsi que la capacité d'insémination des mâles et la fécondité des femelles. La méthode a été développée à l'échelle de l'élevage de laboratoire et adaptée à la production de masse d'*An. arabiensis*. Il s'agissait aussi de tester le matériel de production de masse ainsi que deux méthodes différentes de séchage.

3.2. Méthodologie

3.2.1. Elevage et collecte des œufs

La souche dite Dongola d'*An. arabiensis* originaire du Soudan a été maintenue au laboratoire IPCL selon le protocole décrit dans le chapitre Méthodologie générale (cf. 3.2.1.). L'élevage de routine d'environ 1 000 moustiques maintenus dans des cages (30 x 30 x 30 cm) (Figure 36A) a permis une production d'œufs sur du papier filtre Whatman N°1 pour les expériences d'estimation des œufs. Ces papiers ont été collectés deux fois par semaine. L'élevage dans les cages de production de masse a permis la validation de la méthode par des œufs produits en masse (cf. chapitre 2, 3.2.1.).

3.2.2. Technique de séchage et de pesage des œufs d'anophèles

Pour estimer le poids sec des œufs, 8 échantillons de 1 000 œufs fraîchement pondus ont été comptés et séchés pendant 5 heures sur du papier absorbant de type 'essuie-tout' disposé sur un plateau (30x40 cm) dans des conditions de laboratoire ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $75\pm 5\%$ HR) (Figure 36B). Chaque échantillon sec de 1 000 œufs a été délicatement brossé sur du papier calque

naturel (Figure 36C) puis mis dans un tube Eppendorf de 200 μ l. Un tube Eppendorf vide (taré à l'avance) a été utilisé pour peser chaque échantillon de 1 000 œufs. Après avoir déterminé le poids (Figure 36D) de chaque échantillon de 1 000 œufs, les œufs ont ensuite été transférés dans un autre tube afin de déterminer le poids cumulé de 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000 et 8 000 œufs. Six répliques ont été réalisées à partir de différents lots d'œufs permettant l'établissement d'une courbe d'étalonnage entre le poids sec et le nombre d'œufs. Cette méthode a été validée aussi bien pour les œufs issus des petites cages que des cages de production de masse.

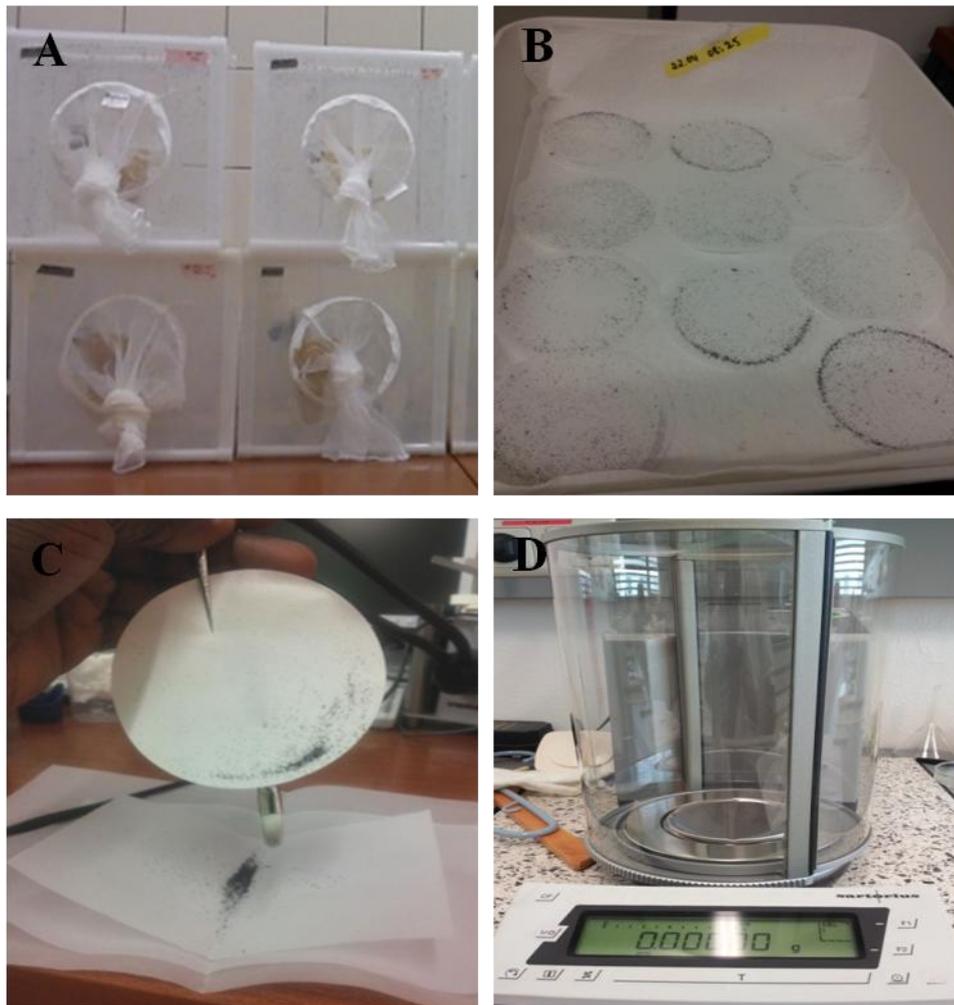


Figure 36 : Etapes de la technique de traitement des œufs de moustiques élevés en cages 30x30x30cm (A), séchage sur du papier dans un plateau (B), brossage (C) et pesage à l'aide d'une balance de précision (D)

3.2.3. Validation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs

L'efficacité de la méthode de détermination du poids sec des œufs a été validée. Pour cela, différents lots d'œufs ont été pesés sur la base du poids sec de 1 000 œufs (14 répliques), de 3 000 œufs (6 répliques) et de 4 000 œufs (6 répliques). Tous ces œufs proviennent des pontes de petites cages d'élevage (30x30x30 cm). Ces œufs ont ensuite été donnés aux lecteurs non avertis qui les ont comptés sous microscope et les nombres observés ont été comparés aux nombres attendus.

3.2.4. Effet de la méthode d'estimation du poids sec des œufs sur le taux d'éclosion

L'effet de la méthode d'estimation du poids sec sur le taux d'éclosion des œufs a été testé avec 12 échantillons de 1 000 œufs comptés à l'aide d'un microscope. Ces œufs ont ensuite été mis directement en éclosion dans de petits bacs (30x40 cm) contenant de l'eau (1,5 litres) et de la nourriture des larves. Douze autres échantillons de 1 000 et 6 échantillons de 3 000 et 4 000 œufs secs ont été aussi pesés puis mis en eau. L'éclosion a été contrôlée une fois par jour et les larves étaient comptées et retirées du bac. Le taux d'éclosion est calculé en divisant le nombre de larves par le nombre total d'œufs mis à éclore.

3.2.5. Effet du séchage sur les traits d'histoire de vie des moustiques

Les pupes et les adultes ayant servi à cette expérience ont été élevés dans des plateaux de production de masse. Pour le traitement des œufs frais, ils ont été comptés sur papiers filtres sous un microscope. De ces œufs, 3 échantillons de 4 000 œufs frais chacun ont été mis en eau dans 3 plateaux de production de masse (100 x 60 x 3 cm) (Balestrino *et al.* 2013) et ont servi de témoin. Le même nombre d'échantillons d'œufs ont été séchés, pesés puis mis en eau comme précédemment décrit. La température de la pièce était maintenue à 30°C permettant d'obtenir une eau à 28°C. Les larves ont été ensuite nourries avec le régime larvaire développé par l'AIEA (Damiens *et al.* 2012) jusqu'à la nymphose : 100 ml / plateau pendant les 3 premiers jours, puis 150 ml du 4^e au 8^e jour. Toutes les nymphes ont été collectées à la main à l'aide d'une pipette.

Les critères suivants (i) le nombre de pupes, (ii) le taux d'émergence, (iii) la longévité des adultes, (iv) la capacité d'accouplement des mâles, (v) la fécondité des femelles et (vi) la taille

des mâles et des femelles ont été évalués puis comparés entre pupes et adultes issus respectivement d'œufs frais et d'œufs séchés.

(i) Le taux de pupaison correspond au nombre total de pupes récolté (par plateau) divisé par le nombre total d'œufs mis en éclosion puis multiplié par 100. La valeur est exprimée en pourcentage.

(ii) Le taux d'émergence correspond au nombre d'adultes émergés divisé par le nombre total de pupes puis multiplié par 100. Un nombre de 50 pupes mâles et de 50 pupes femelles ont été mises dans des cages (30x30x30 cm) et 24h plus tard, tous les moustiques ayant émergés ont été comptés pour chacun des deux sexes séparément. Le suivi de l'émergence a été faite en trois répliques pour chaque type de pupes obtenues à partir d'œufs frais et séchés.

(iii) La longévité des adultes : 50 mâles et 50 femelles nouvellement émergés ont été mis dans des cages d'élevage (30x30x30 cm) contenant une solution sucrée à 5%. Les moustiques morts ont été enlevés des cages, séparés par sexe et enregistrés quotidiennement jusqu'au dernier. Le suivi de la survie a été effectué en trois répliques selon que les moustiques sont issus d'œufs frais ou séchés.

(iv) La capacité d'accouplement des mâles et la fécondité des femelles : Pour tester la capacité d'accouplement des mâles, 50 mâles obtenus à partir d'œufs frais et 50 autres à partir d'œufs séchés ont été mis en cages (30x30x30 cm) avec 50 femelles issues d'œufs frais pour chaque groupe de mâles. Les femelles ont été nourries au sang à l'aide de l'hémotek pendant 1 heure, au 5^e jour après l'accouplement. Les femelles gorgées ont été ensuite mises en pontes groupées 3 jours après le repas de sang, dans des bols en plastique contenant un filtre en papier maintenu sur une éponge humide. Les œufs récoltés ont ensuite été comptés pour estimer la fécondité moyenne par traitement selon que les femelles sont issues d'œufs frais ou séchés. Enfin, pour évaluer l'état d'insémination, les femelles survivantes après la ponte ont été disséquées sous microscope.

(v) La taille des adultes : L'effet du séchage des œufs sur la taille des mâles de moustiques et femelles a été testé. Les ailes de 30 mâles et de 21 femelles issus d'œufs frais ont été mesurées puis comparées aux mêmes nombres de mâles de moustiques et femelles issus d'œufs séchés.

3.2.6. Autre méthode de séchage: effets sur l'estimation du poids sec et sur le taux d'éclosion

La méthode antérieure de séchage pendant 5 heures dans les conditions de laboratoire n'est pas très pratique en conditions de production de masse. Nous avons donc testé une autre méthode plus rapide, permettant de réduire le temps de séchage à 30 mn en utilisant un dispositif d'aspiration muni d'un ventilateur à vitesse réglable précédemment développé par Dame *et al.* (1978). Les œufs frais sont alors soumis à une ventilation sous un flux d'air de 1,8 m/s pendant que d'autres œufs frais sont aussi séchés dans les conditions de laboratoire comme précédemment décrit. Pour chacune des deux méthodes de séchage, les œufs sont récoltés par brossage et mis ensemble puis 7 échantillons de 1 000 œufs ont été pesés. Le nombre exact d'œufs (nombre observé) de chaque échantillon de 1 000 œufs a été déterminé en comptant sous un microscope puis comparé au nombre d'œufs attendu.

La fertilité des œufs a été testée sur 7 échantillons d'environ 80 œufs séchés suivant les deux méthodes. Pour ce faire, les œufs ont été mis en eau additionnée de nourriture puis les œufs éclos ont été comptés et rapportés au nombre total d'œufs mis en eau.

3.2.7. Adaptation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs à la cage de production de masse

Afin d'adapter la méthode d'estimation préalablement développée avec les petites cages (30x30x30 cm) aux cages de production de masse (200x100x10 cm), le taux d'éclosion a été évalué en plus de la comparaison entre le nombre exact d'œufs (nombre observé) déterminé et le nombre d'œufs attendu de chaque échantillon (cf. Partie 3, 3.2.3). Pour ce faire, 6 échantillons de 1 000, 3 000 et 4 000 œufs secs chacun récoltés des cages de production de masse ont été pesés puis comptés.

Le taux d'éclosion a été évalué pour 3 échantillons de 1 000 œufs séchés puis comparés aux contrôles.

3.2.8. Production de masse de pupes

Avant de tester le prototype entier (rack), la production de pupes a été évaluée en utilisant les plateaux individuels plutôt qu'en utilisant le système du rack comme décrit dans la section Méthodologie générale (cf. Figure 15A-B) avec 4 000 (6 répliques) et 5 000 (15 répliques) œufs séchés par plateau. Chaque plateau est rempli de 4 litres d'eau distillée.

La production du rack entier a été testée par la suite une fois avec 25 puis 50 plateaux contenant chacun 5 000 œufs.

Le régime larvaire quotidien développé à l'AIEA (Damiens *et al.* 2012) a été établi comme suit : 100 ml pour les 3 premiers jours suivant la mise en eau des œufs et 150 ml jusqu'au jour 8. Les pupes ont été collectées à l'aide d'une pipette et comptées (pour chaque plateau).

3.2.9. Amélioration de la production de masse d'œufs

Afin d'améliorer la productivité de la cage IPCL initiale de production de masse, les tests suivants ont été réalisés à partir d'adultes issus d'œufs de l'élevage en petites cages 30x30x30 cm :

(i) Trois cages (200x100x10 cm) (Figure 37) contenant chacune 7 000 moustiques (mâles et femelles à nombre égal) sur 3 jours consécutifs. Les femelles ont été nourries quotidiennement au sang de bovin pendant 2 heures entre 09:00 et 11:00 et ce pendant une semaine à partir du 4^e jour après la mise en cages des pupes. Les moustiques morts ont été collectés quotidiennement dans les 3 cages testées afin d'évaluer la survie. Les œufs ont été collectés 3 jours après le premier repas sanguin. Le design expérimental a été développé comme suit :

- La Cage 1 est l'ancien prototype avec le tube en aluminium contenant le sucre 5% (Figure 37A)

- La Cage 2 est l'ancien prototype additionné de récipients contenant du papier filtre trempée dans une solution sucrée 5% en permanence (Figure 37B)

- La Cage 3 est l'ancien prototype contenant un site de repos de couleur noir fixé au haut de la cage au milieu (Figure 37C).

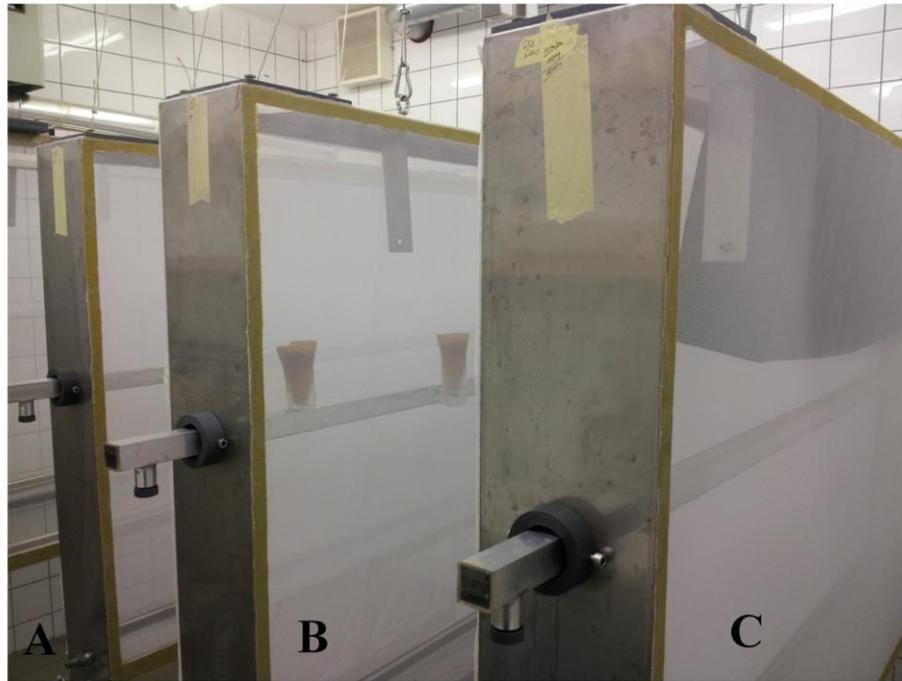


Figure 37 : Différents designs de cages de production de masse expérimentés. Cage 1 (A), Cage 2 (B) et Cage 3 (C).

(ii) L'effet du type d'élevage (plateaux individuels et système rack) sur la production hebdomadaire d'œufs des cages a été estimé. Pour ce faire, les larves ont été élevées dans des plateaux individuels placés sur des tables et dans le rack à larves et à pupes jusqu'à la nymphose. 10 000 moustiques (mâles et femelles à égal nombre) âgés de 1 et 3 jours, obtenus à partir des pupes provenant de chaque type d'élevage ont été disposés dans les cages de production de masse (200x100x10 cm). Cinq cages (répliques) de chaque type ont été suivies. Les femelles ont été nourries au sang quotidiennement pendant 2 heures entre 09:00 et 11:00. Les œufs ont été collectés à l'aide de tamis puis soigneusement recueillis sur du papier filtre (Figure 38). Les œufs ont ensuite été séchés puis pesés afin de déterminer le nombre d'œufs /cage/jour/ type d'élevage.

La dynamique quotidienne de la production des cages (200x100x10 cm) contenant 10 000 moustiques (mâles et femelles) a ensuite été évaluée sur 11 répliques indépendamment du type d'élevage.



Figure 38 : Des milliers d'œufs des cages de production de masse recueillis sur du papier filtre

3.3. Résultats

3.3.1. Estimation du poids sec

La Figure 39 illustre la relation entre le nombre d'œufs comptés et le poids correspondant. Le coefficient de corrélation de Pearson entre ces deux paramètres est 0,988 et est significatif ($P < 0,001$). L'équation de la régression linéaire qui en résulte est : **Poids (mg) = 0,536 + 0,00399 x Nombre d'œufs comptés.**

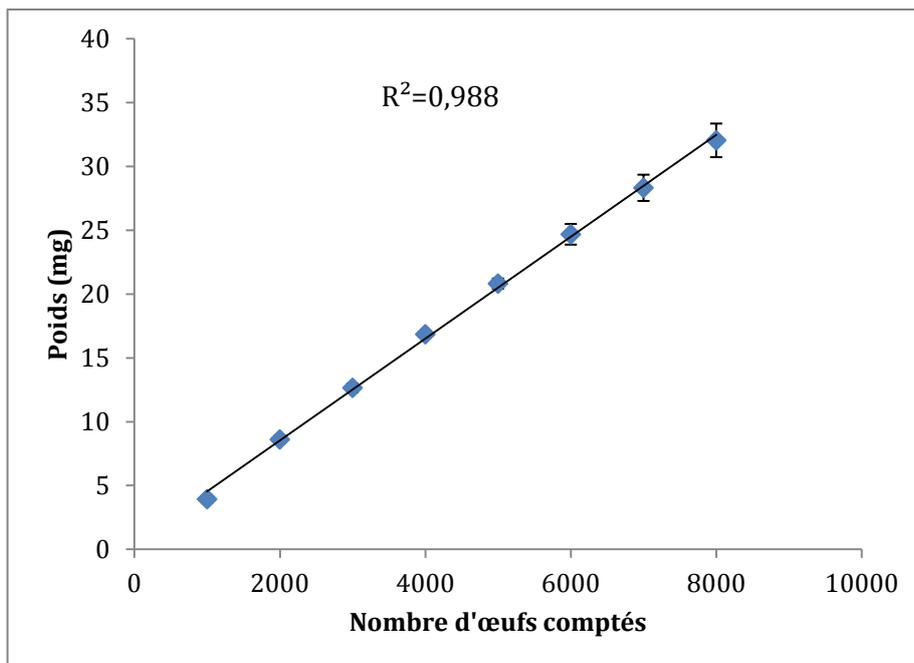


Figure 39 : Courbe d'étalonnage entre le poids sec et le nombre d'œufs comptés

3.3.2. Validation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les nombres d'œufs observés après la pesée puis comptés sous un microscope et les nombres d'œufs attendus correspondants aux échantillons de 1 000 ($\chi^2 = 11,70$, $df = 13$, $P = 0,5$), 3 000 ($\chi^2 = 7,49$, $df = 5$, $P = 0,18$) et 4 000 œufs ($\chi^2 = 3,56$, $df = 5$, $P = 0,6$) (Tableau VI).

Tableau VI : Comparaison entre nombres observés et nombres attendus d'œufs secs issus de l'élevage en petites cages et des cages de production de masse

Nombre d'œufs attendu	Nombre d'œufs observé (Moy ± se (N))	
	Petites cages	CPM
1000	989± 11 (14)	896± 23 (6)
3000	3032± 39 (6)	2557± 80 (6)
4000	4270± 32 (6)	3737± 137 (6)

se = erreur standard et (N) = nombre de recouvrement des échantillons d'œufs. CPM = cages de production de masse. Moy = Moyenne.

3.3.3. Effets de la méthode d'estimation du poids sec des œufs sur le taux d'éclosion

Le taux d'éclosion varie significativement (ANOVA, $F_{3, 26} = 3,41$, $P < 0,05$) entre les échantillons d'œufs secs pesés ($67,5 \pm 4,1$, $75,2 \pm 2,4$, $73,6 \pm 2,2$ % pour 1 000, 3 000 et 4 000 œufs respectivement) et le contrôle d'œufs frais ($66,2 \pm 11,8$ % pour 1 000 œufs). Toutefois, aucune différence significative n'a été observée lorsque les taux d'éclosion sont comparés entre eux deux à deux (Turkey Post hoc tests, $P > 0,05$).

3.3.4 Effet du séchage sur les traits d'histoire de vie des moustiques

Les résultats sur les traits d'histoire de vie (à l'exception de la longévité) des moustiques sont présentés dans le Tableau VII. Aucune différence significative n'a été observée sur tous les critères énumérés selon le type d'œufs frais et séchés.

Concernant la longévité, le test de Mantel-Cox (log-rank) a montré une meilleure survie des mâles élevés à partir d'œufs frais ($\chi^2 = 7,06$, $df = 1$, $P = 0,007$) avec le dernier moustique mort au jour 35. Toutefois, aucune différence statistique n'a été constatée lorsque la longévité a été suivie jusqu'au jour 21 ($\chi^2 = 0,004$, $df = 1$, $P = 0,9$) lorsque 80% des mâles étaient morts

(Figure 40A). Le séchage n'influencerait pas la longévité des femelles de moustiques ($\chi^2=0,008$, $df=1$, $P=0,9$) (Figure 40B).

Tableau VII : Comparaison des traits d'histoire de vie des moustiques selon le type d'œufs secs ou frais élevés dans les plateaux de production de masse

Paramètres	Type d' œufs		Test statistique
	Frais	Sec	
TP (%)	58,5 ± 3,2	63,1 ± 10,3	(U=3, P=0,7)
TE (%)	94,6 ± 1,4	93,4 ± 1,5	t=0,6, df=5, P=0,5
TI (%)	74,2 ± 8,2	84,6 ± 7,2	MW (U=2, P=0,4)
F	772,3 ± 118,9	619,3 ± 331,4	t=0,6, df=5, P=0,5
Lg mâle (µm)	3122,8 ± 23,1	3118,5 ± 16,1	t=0,13, df=29, P=0,8
Lg femelle (µm)	3433,05 ± 22,4	3400,27 ± 18,4	t=1,55, df=20, P=0,1

TP= taux de pupaison; TE=taux d'émergence, TI=taux d'insémination, F= fécondité, Lg= taille des ailes.

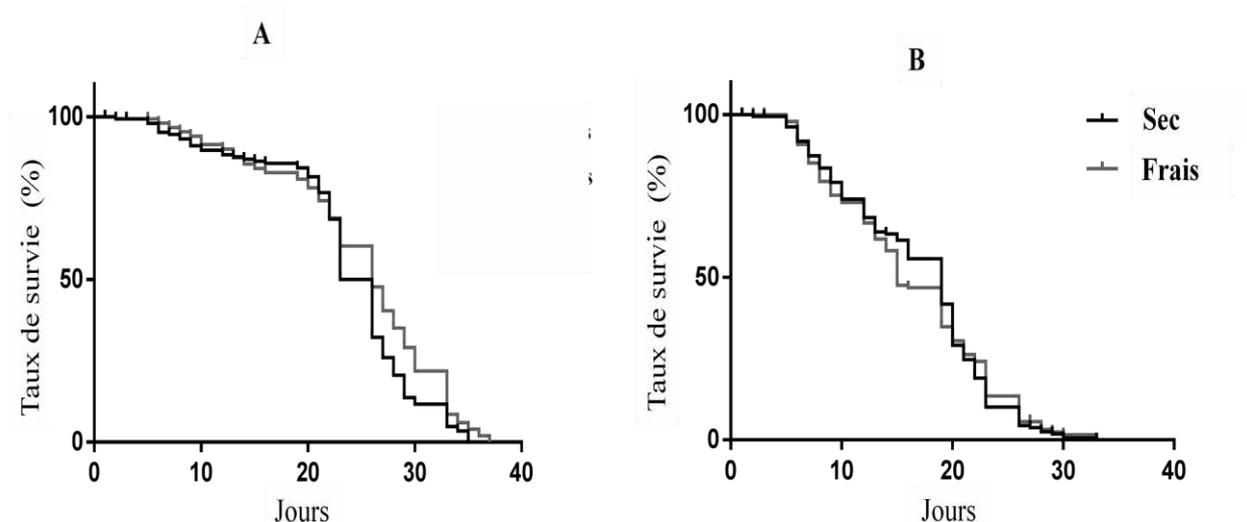


Figure 40 : Courbes de survie (Kaplan-Meier) des mâles (A) et femelles (B) issus d'œufs frais ou secs.

3.3.5. Autre méthode de séchage: effets sur l'estimation du poids sec et sur le taux d'éclosion

La méthode de séchage (rapide ou lente) n'influencerait pas le taux d'éclosion (Rapide : $88,4 \pm 2,2\%$ vs lente : $78,7 \pm 5\%$: $t = 1,41$, $df=6$, $P=0,2$). Le nombre d'œufs observé en moyenne est significativement plus élevé avec la méthode de séchage rapide pendant 30 mn à l'aide de l'aspiration comparée à la méthode lente pendant 5 heures de séchage (t-test, Rapide : $1\ 075 \pm 9$ vs lente : $1\ 024 \pm 7$: $t = 5,77$, $df=4$, $P=0,004$).

3.3.6. Adaptation de la méthode d'estimation du poids sec des œufs à la cage de production de masse

La différence entre le nombre d'œufs attendu et le nombre observé sur les échantillons de 3 000 et 4 000 œufs provenant des cages de production de masse était significative ($\chi^2=40,8$, $df=5$, $P < 0,0001$ et $\chi^2 = 81,8$ $df=5$, $P < 0,0001$ pour 3 000 et 4 000 œufs respectivement). Cependant aucune différence n'a été observée pour les échantillons de 1 000 œufs ($\chi^2=9,5$, $df=5$, $P= 0,08$) (Tableau VI).

La méthode de collecte et de séchage des œufs de la cage de production de masse n'aurait pas d'effet sur leur taux d'éclosion ($65,6 \pm 1,6$ contre $69,2 \pm 3,3$ pour le contrôle) (Mann Whitney Test: $U=3$, $P=0,7$).

3.3.7. Production de masse de pupes

La dynamique d'apparition des pupes dans les plateaux s'est étalée sur 7 jours avec le maximum (soit 80% du total) sur 3 jours entre le 7^e et le 9^e jour après la mise en eau des œufs. (Figure 41). La proportion de pupes obtenue avec 5 000 œufs ($2\,558 \pm 87$ soit $51,17 \pm 1,86\%$) était similaire à celle obtenue avec à 4 000 œufs ($2\,124 \pm 97$ soit $53,1 \pm 2,87\%$) (Unpaired t-test, $t=0,5$, $df=19$, $P=0,5$).

La production en pupes estimée à partir de 125 000 et 250 000 œufs distribués dans 25 et 50 plateaux respectivement dans deux racks juxtaposés était de 41 750 et 91 000 pupes soit 33,4 et 36,4% respectivement.

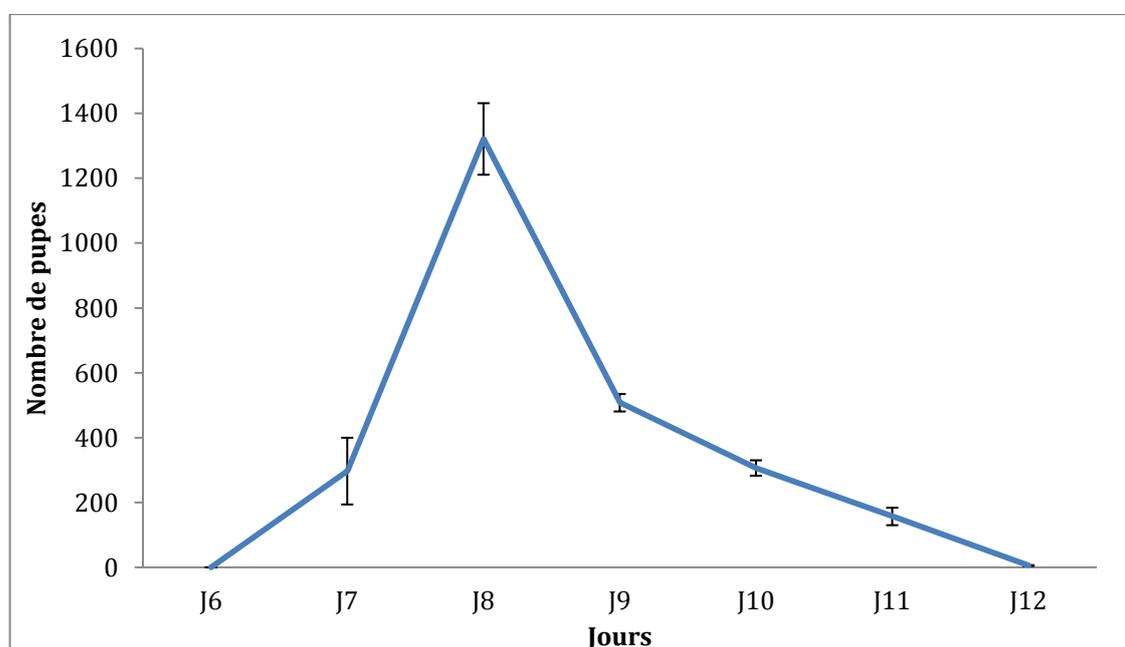


Figure 41 : Dynamique de pupaison dans les plateaux de production de masse (hors du système du rack)

3.3.8. Amélioration de la production de masse d'œufs

Les différents designs du prototype initial de la cage IPLC de production de masse testés en une fois ont produit très peu d'œufs (Cage 1: 977 Cage 2: 171, Cage 3: 525 comptés après éclosion des œufs). Au bout du 13^e jour, 58%, 37% et 49% des moustiques sont morts dans les cages 1, 2 et 3 respectivement.

Les résultats des tests effectués sur le nouveau prototype de la cage de production de masse ont montré que le type d'élevage (plateaux individuels ou rack) n'affectait pas

significativement la production des œufs (t-test, Plateaux : $191\,456 \pm 27\,922$, rack : $166\,775 \pm 22\,463$; $t=0,58$, $df=4$, $P=0,5$). Cependant, la production quotidienne moyenne d'œufs par cage était plus élevée pendant les 4 premiers jours ($31\,314 \pm 904$) puis décline significativement après le 4^e jour ($17\,670 \pm 1\,050$) (Figure 42). La production hebdomadaire cumulée pour 11 cages de 10 000 moustiques était de l'ordre de 1 960 942 œufs.

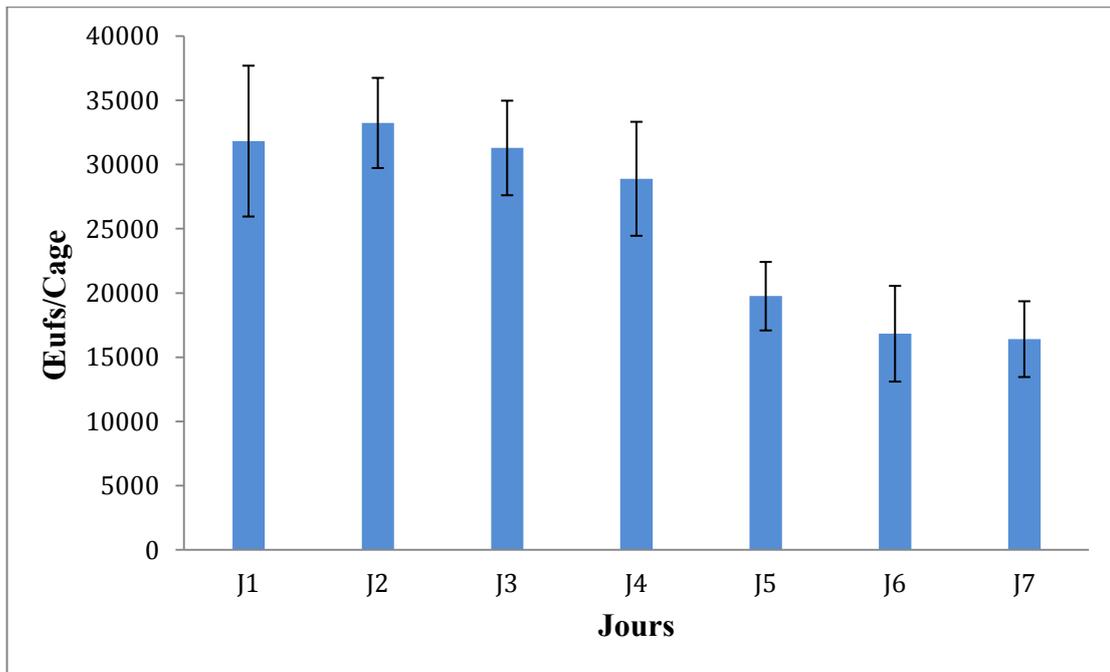


Figure 42 : Production journalière d'œufs par cage pour les deux types d'élevage confondus

3.4. Discussion

Les résultats ont montré qu'il est possible d'élever en masse et de réaliser une estimation du nombre d'œufs d'*An. arabiensis* suivant un processus combinant le séchage, brossage et pesage sans affecter pour autant la qualité des œufs. Ces différents traitements réalisés sur différents lots d'œufs n'ont pas eu d'effet sur le taux d'éclosion, la pupaison, l'émersion et sur les traits d'histoire de vie des adultes. Il était donc important de standardiser toutes les étapes de l'élevage de masse depuis l'étape des œufs jusqu'à l'obtention des pupes.

Une bonne relation entre le nombre et le poids d'œufs secs a été observée. La méthode a été validée en comparant le nombre d'œufs attendu au nombre d'œufs observé après la pesée puis comptage sous microscope. Le nombre d'œufs observé pour les échantillons de 4 000 était significativement plus élevé que les nombres attendus. Cela est probablement dû à

l'augmentation de la variabilité liée au nombre d'œufs. Cependant, pour corriger cette variabilité, un simple ajustement par rapport aux valeurs attendues pourrait être effectué.

Dans cette étude, le processus de séchage n'affecte pas la qualité des œufs, comme précédemment observé par Khan *et al.* (2013). D'autres études effectuées sur *An. quadruanulatus* et *An. albimanus* ont prouvé que les œufs pourraient survivre au séchage et même au stockage (Bailey *et al.* 1979). Bien que les œufs d'anophèles aient montré dans des conditions expérimentales, une certaine tolérance à la déshydratation et une capacité de survivre à l'assèchement temporaire des gîtes larvaires en milieu naturel (Clements, 1992), ils ne peuvent pas résister à un séchage prolongé (Khan *et al.* 2013).

Le broyage n'a eu également aucun effet sur la vie larvaire et celle des adultes. Cette absence d'effet du broyage sur la vie larvaire et les traits de vie adulte est plutôt observée chez les œufs d'*Aedes* qui se prêteraient plus à ce genre de manipulations sans effet notable sur le taux d'éclosion (Mains *et al.* 2008). En effet, les *Aedes* déposent leurs œufs sur du substrat humide tandis que *An. arabiensis* pond généralement à la surface de l'eau. Les œufs flottent grâce à deux expansions de l'exochorion remplies d'air (Clements 1992). Il se pourrait alors que ces flotteurs soient endommagés par le broyage. Cependant, même si cela a pu se produire, il n'a pas affecté le taux d'éclosion. Cela signifie que ni le séchage ni le broyage n'affecte de façon significative la viabilité des œufs d'*An. arabiensis*.

Quoique le processus de séchage pendant 5 heures dans les conditions de laboratoire n'affecte pas la qualité des œufs, il ne serait pas très pratique dans une chaîne de production de masse du fait du temps de séchage. La technique développée par Dame *et al.* (1978) puis récemment utilisée par Khan *et al.* (2013) à l'aide d'un dispositif d'aspiration a permis de sécher des œufs au bout d'une demi-heure sans dommage. Cette technique plus rapide permet de sécher des milliers d'œufs à la fois. Toutefois, elle surestime le nombre d'œufs. En effet, le nombre d'œufs observé pour un échantillon d'œufs séchés à l'aide de l'aspirateur est significativement plus élevé que celui de l'échantillon séché pendant 5 heures. Cela pourrait être dû au fait que pour le même poids, l'échantillon soumis à un séchage rapide contient plus d'œufs froissés, donc plus légers, du fait de la perte accélérée en eau comparativement aux œufs soumis à un séchage lent. Cependant, la variation semble être assez constante et pourrait être prise en compte lors de la quantification des œufs.

Lorsque la méthode de quantification est appliquée aux œufs de la cage de production de masse recueillis à l'aide de différentes tailles de tamis, aucun effet sur le taux d'éclosion n'a été observé. Cela signifie que la méthode pourrait donc être utilisée dans une chaîne de

production de masse. Toutefois, lorsque l'équation reliant le nombre d'œufs et leur poids sec était utilisée pour estimer ces œufs, le nombre observé était inférieur à celui attendu. Cela, du fait qu'en cages de production de masse, les adultes morts tombent à la surface de l'eau où les femelles déposent aussi leurs œufs. Cependant le tamisage utilisé pour séparer les œufs des résidus de moustiques, apporte des fines particules comme les écailles, la cuticule, les fragments de pattes, du thorax, de l'abdomen et des ailes. Ainsi, lorsque les œufs de la cage de production de masse ont été pesés, entre 7 et 13% du poids total des œufs représentait le poids des débris. La proportion quotidienne de débris pourrait varier du fait de la mortalité différentielle d'une cage à l'autre. Plus il y a de morts collectés avec les œufs, plus il y a de débris à prendre en compte. Deux options pourraient être envisagées pour résoudre ce problème. Un nettoyage supplémentaire des œufs comme précédemment proposé par Khan *et al.* (2013) et qui consisterait à relaver les œufs déposés sur du tissu poreux et qui ne laisserait passer que les débris, pourrait être envisagé. Toutefois, le lavage supplémentaire ne devrait pas endommager les œufs et réduire ainsi le taux d'éclosion pouvant affecter la production de moustiques de qualité. La seconde option serait de prendre la variation en compte, en supposant qu'elle soit constante, en pesant 10% du poids des œufs en plus.

Le rendement de l'élevage de masse dans les plateaux contenant 4 000 et 5 000 œufs a été estimé à 50% environ dont 80% des pupes ont été collectées en trois jours. Cela signifie que les plateaux développés par IPCL pourraient être utilisés pour la production des pupes. Cependant, il serait nécessaire d'améliorer la synchronisation de la pupaison afin de gagner en temps, voire augmenter le rendement. La synchronisation est aussi importante afin d'avoir le maximum de pupes du même âge pour l'irradiation par exemple (Helinski *et al.* 2006). En supposant que les œufs utilisés soient de la cage de production de masse, le rendement de la production des plateaux pourrait augmenter en prenant en compte la proportion de 10% de débris. Aussi, sachant que le taux d'éclosion trouvé dans notre étude est d'environ 70%, le rendement réel des plateaux serait supérieur à 80 % du nombre de larves. Cela démontre qu'il est important de synchroniser l'éclosion afin d'améliorer le rendement de la pupaison. Par contre, l'élevage dans le rack a fourni un rendement plus faible, 30% (estimé à partir des œufs) et 50% (à partir du nombre de larves). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le taux d'éclosion soit plus faible que dans les plateaux individuels exposés sur des tables. En effet, l'espace entre deux plateaux dans le rack pourrait modifier les conditions de luminosité mais aussi d'humidité. Certaines études ont par exemple démontré le rôle des conditions environnementales (humidité, type d'eau) mais aussi de la température sur le taux d'éclosion

(Yaro *et al.* 2006, Impoinvil *et al.* 2007). Dans les conditions optimales le taux d'éclosion chez *An. gambiae* atteindrait 90% au bout de 3 jours de mise en eau (Beier *et al.* 1990). Le faible rendement obtenu dans notre étude pourrait aussi être dû à la mortalité larvaire, lors de la collecte des pupes du rack. La collecte consistant à drainer tout le mélange de larves et pupes dans un volume de 100 litres pourrait affecter la survie des larves. Cependant, le développement d'une méthode plus souple de drainage contribuerait à rehausser le rendement du rack.

Si le rendement du rack semble être inférieur à celui des plateaux individualisés, ce type d'élevage ne semble pas influencer significativement la qualité des moustiques en termes de production d'œufs. La productivité quotidienne moyenne de la cage était à 30 000 œufs/cage pendant les quatre premiers jours. Cette distribution des œufs pourrait être due au fait que les moustiques étaient de différents âges. Ce qui aurait comme conséquence directe, la prise du repas sanguin à différents jours. Sachant qu'*An. arabiensis* pond 1 ou 2 fois à l'insectarium (Diop *et al.* 1998), il serait préférable en production de masse de fournir des moustiques d'un même âge afin d'avoir le maximum d'œufs les premiers jours. Les données cumulées de la production de 11 cages qui ont été présentées ici ont montré pour la première fois que la production de masse d'*An. arabiensis* est possible. Cela pourrait par exemple permettre l'estimation du nombre de cages afin de produire jusqu'à 1 000 000 adultes par jour nécessaires à l'atteinte des objectifs du projet TIS au Soudan.

3.5. Conclusion partielle

Dans la présente étude, une méthode rapide et efficace de collecte des œufs et de quantification sans affecter la qualité des œufs a été développée. Cette méthode a permis une distribution uniforme des œufs dans les plateaux du rack de production de masse de larves et pupes ayant abouti à un rendement de productivité pré-imaginale de 50%. C'est une importante étape vers le développement d'une chaîne de production de masse en vue de l'application de la lutte génétique contre les vecteurs du paludisme, basée sur les lâchers massifs de mâles stériles ou génétiquement modifiés. Il serait alors important de développer une méthode de stérilisation, voire de contrôle de la qualité des moustiques stériles produits en masse au laboratoire puis testés en milieu semi-naturel.

Une partie des résultats de cette étude sera présentée dans l'article :
Maïga H, Damiens D, Diabaté A, Dabiré RK, Ouédraogo GA and Gilles JRL. Large-scale *Anopheles arabiensis* egg quantification methods for mass-rearing operations. (En préparation)

PARTIE 4: Compétitivité sexuelle des mâles stériles de moustiques en grandes cages de laboratoire

Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article :

Maïga H, Damiens D, Niang A, Sawadogo SP, Fatherhaman O, Lees RS, Roux O, Dabiré KR, Ouédraogo GA, Tripet F, Diabaté A and Gilles JRL. Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzii* in large cages. *Malar J.* 2014; 13:460

4.1. Introduction

Le succès d'un programme de la lutte intégrée anti-vectorielle associant une composante TIS dépend clairement de la capacité des mâles stériles de laboratoires à localiser les femelles et transférer leur sperme aux femelles sauvages (Knipling, 1955). La sélection induite par la colonisation et l'élevage en masse peut altérer la qualité des mâles produits en modifiant leur capacité reproductrice (Benedict *et al.* 2009b). En outre, selon l'âge des pupes au moment de l'irradiation, la stérilisation par irradiation induit des dommages aux cellules somatiques, (Andreasen et Curtis, 2005, Helinski et Knols, 2009) et conduit à une réduction de la capacité d'accouplement des mâles stériles (Helinski *et al.* 2009, Yamada *et al.* 2014).

La plupart des travaux étudiant les capacités d'accouplement des mâles stériles d'*An. coluzzii* ont été principalement réalisés en petites cages dans les conditions de laboratoire (Andreasen et Curtis, 2005). Reisen (2003) a montré que ces conditions ne refléteraient pas exactement la performance dans l'environnement naturel. Une étude récente a rapporté les premières comparaisons de survie et le succès de l'accouplement des souches de laboratoire d'*An. coluzzii* par rapport aux individus sauvages dans des conditions semi-naturelles (Paton *et al.* 2013). La même étude a montré comment l'élevage au laboratoire affecterait le comportement d'accouplement avec une réduction de la survie et du succès de l'accouplement contrairement à la souche élevée en milieu semi-naturel. Une étude sur les mâles stériles d'*Ae. albopictus* a montré qu'ils sont aussi compétitifs en petites cages au laboratoire qu'en grandes cages, en serre expérimentale (Madakacherry *et al.* 2014). Cependant, d'autres études ont montré que les mâles en captivité pourraient développer un comportement d'essaimage et d'accouplement différent de celui des populations sauvages (Benedict *et al.* 2009b, Marchand, 1985) et pourraient donc échouer en milieu naturel. Ceci suggère que des études sur la

compétitivité sexuelle dans de grandes cages en serre expérimentale soient nécessaires afin d'évaluer l'efficacité des mâles stériles dans des enceintes qui prennent en compte des variations naturelles de l'environnement avant de relâcher les moustiques sur le terrain.

Dans cette étude, l'effet de la stérilisation partielle avec une dose de 90 Gy sur la compétitivité sexuelle d'*An. coluzzii* dans trois différents ratios mâles stériles: mâles non traités dans les grandes cages, a été évaluée. La dynamique de cette compétition a aussi été déterminée en comparant la compétitivité des mâles stériles après un jour et après deux jours de contact avec les femelles.

4.2. Méthodologie

4.2.1. Technique de stérilisation

La souche d'*An. coluzzii* colonisée au laboratoire IPCL a été utilisée pour cette étude (cf. chapitre 2, 2.3.2 a). Les pupes d'âge compris entre 22 et 26h ont servi à l'irradiation aux rayons Gamma grâce à l'irradiateur Gamma cell 220 ^{60}Co (Figure 43) avec la dose de 90 Gy. Pour cela, la présence de pupes dans tous les plateaux d'élevage a été vérifiée et seules les pupes apparues entre 9h00 et 15h00 chaque jour ont été recueillies et irradiées à 11h00 le jour suivant le protocole décrit par Helinski *et al.* (2006). Avant la stérilisation, les nymphes ont été séparées par sexe sous un microscope. Des lots de 100 à 200 nymphes ont été irradiées à la fois. Un système de dosimètre (Gafchromic HD-810 film, International Speciality Products, NJ, USA) a permis de vérifier la dose d'irradiation reçue par les pupes après chaque séance d'irradiation.



Figure 43: Irradiateur à rayon gamma (^{60}Co , IPCL, Seibersdorf)

4.2.2. Tests de compétitivité sexuelle des mâles en grandes cages en serre expérimentale

Les expériences ont été menées dans des grandes cages d'environ 1,75 m², dans la serre expérimentale de l'Unité d'Entomologie de la FAO/AIEA, à Seibersdorf (Autriche). Les moustiques ont été lâchés sous des conditions climatiques contrôlées (températures moyennes de 24,7±0,6 °C, le matin et 26,7±0,2° C, la soirée, et 50% d'humidité relative) à la lumière naturelle. Un plateau (30 x 40cm) contenant 1 litre d'eau de robinet a été fourni en guise de site de repos 'frais' dans chaque cage. Des conteneurs de solution de sucre de 5% ont été posés à proximité (Figure 44).

Les mâles de moustiques et femelles d'âge compris entre 4 et 6 jours ont été lâchés en trois répliques dans 3 cages différentes selon les ratios (mâles stériles: mâles non traités: femelles vierges) suivants: 100:100:100, 300:100:100 et 500:100:100. Deux autres cages ayant servi de contrôle stérile (avec 100 mâles stériles et 100 femelles) et de contrôle non traité (avec 100 mâles fertiles et 100 femelles) ont été inclus au cours de chacune des trois répliques. Au troisième jour de contact avec les mâles, toutes les femelles ont été retirées à l'aide d'un aspirateur et mises en petites cages (30 x 30 x 30 cm) afin d'être nourries pendant deux jours consécutifs à raison de 30 minutes par séance au sang de bovin. Les femelles nourries au sang ont été gardées pendant trois jours après le dernier repas de sang puis soumises à une ponte en masse pendant 2 jours consécutifs. Les œufs recueillis chaque jour ont été rincés et éclos pendant 2 jours. Le taux d'éclosion a ensuite été évalué en comptant le nombre d'œufs éclos sous un microscope. Pour évaluer le statut d'insémination des femelles, la dissection de la spermathèque a été faite.

La formule $((H_n - H_o) / (H_o - H_s)) * (N/S)$ a été utilisée pour calculer l'index de compétitivité (C) pour le ratio 100:100:100, tel que décrit par Fried (1971), où H_n et H_s représentent le taux d'éclosion des œufs de femelles accouplées avec des mâles non traités et les mâles stériles, respectivement; H_o est le taux d'éclosion observé (ratio testé); N est le nombre de mâles non traités et S est le nombre de mâles stériles.



Figure 44 : Grande cage d'environ 1,75 m², dans la serre expérimentale ayant servi aux tests de compétitivité sexuelle des moustiques stériles vs non traités.

4.2.3. Analyse de la compétition en fonction du temps de contact

La dynamique temporaire de la compétition a été évaluée selon les conditions citées précédemment (cf. Partie 4, 4.2.2) en utilisant seul le ratio de 500:100:100 de mâles stériles: mâles non traités: femelles vierges. Le taux d'insémination et d'éclosion a été mesuré comme précédemment après 1 et 2 jours puis comparés. Cette expérience a été menée en 3 répliques incluant à chaque fois des contrôles (mâles stériles et mâles non traités).

4.3. Résultats

4.3.1. Compétitivité des mâles d'*An. coluzzii* irradiés

Lorsque les mâles et les femelles ont été mis en contact pendant deux jours, une différence significative des taux d'insémination a été observée en fonction des différents ratios mâles stériles: mâles non traités (LRT $\chi^2=35,86$; $df= 4$; $P=0,001$) (Tableau VIII). Le taux

d'insémination dans tous les ratios était significativement différent à la fois des mâles stériles et des mâles non traités (test posthoc de Tukey : tous : $P < 0,01$). Le taux d'insémination des femelles par les mâles non traités (contrôle fertile) était également significativement différent de celui des femelles inséminées par les mâles stériles (contrôle stérile) (test de Tukey posthoc: $Z = -3,47$; $P=0,004$). Toutefois, le taux d'insémination dans les trois ratios testés n'a pas été significativement différent d'un ratio à un autre (test posthoc de Tuckey : tous $P > 0,05$).

Tableau VIII : Compétitivité des mâles au bout de deux jours (Taux d'insémination et d'éclosion) en fonction des différents ratios mâles stériles: mâles non traités

Ratio	Taux d'insémination (%)	S /N	Taux d'éclosion (%)	Index de compétitivité (C)
CNT	81,28±3,11 ^a		86,47 (Hn)	
CS	67,38±1,55 ^b		18,64 (Hs)	
100:100:100	92,23±1,28 ^c	1	63,99 (Ho)	0,53±0,16
300:100:100	94,83±0,41 ^c	3	55,24 (Ho)	
500:100:100	93,89±1 ^c	5	37 (Ho)	

Différentes lettres indiquent des différences significatives (Tukey's posthoc test $P < 0,05$). Hn et Hs sont les taux d'éclosion des œufs pondus par des femelles inséminées par des mâles non traités (contrôle non traité (CNT) et stériles (contrôle stérile (CS)) respectivement. Ho est le taux d'éclosion observé pour chaque ratio testé et N= nombre de mâles non traités et S= nombre de mâles stériles.

Le taux d'éclosion des œufs a été significativement influencé par le ratio des mâles stériles (LRT $\chi^2=52,50$; $df=4,4$ $P < 0,001$) (Figure 45). Les taux d'éclosion des trois ratios étaient significativement différents à la fois de celui du contrôle stérile et de celui du contrôle non traité (test posthoc de Tuckey: tous $P < 0,001$). Le taux d'éclosion de chacun des trois ratios était aussi différent l'un de l'autre (test posthoc de Tuckey : tous $P < 0,001$), à l'exception des ratios de 100:100:100 et 300:100:100 (test de Tuckey posthoc : $Z=-2,29$; $P=0,14$; Figure 45). L'index de compétitivité (C) de Fried des mâles stériles comparé aux contrôles est de 0,53,

signifiant que les mâles stériles étaient à moitié aussi compétitifs que les mâles non traités (Tableau VIII).

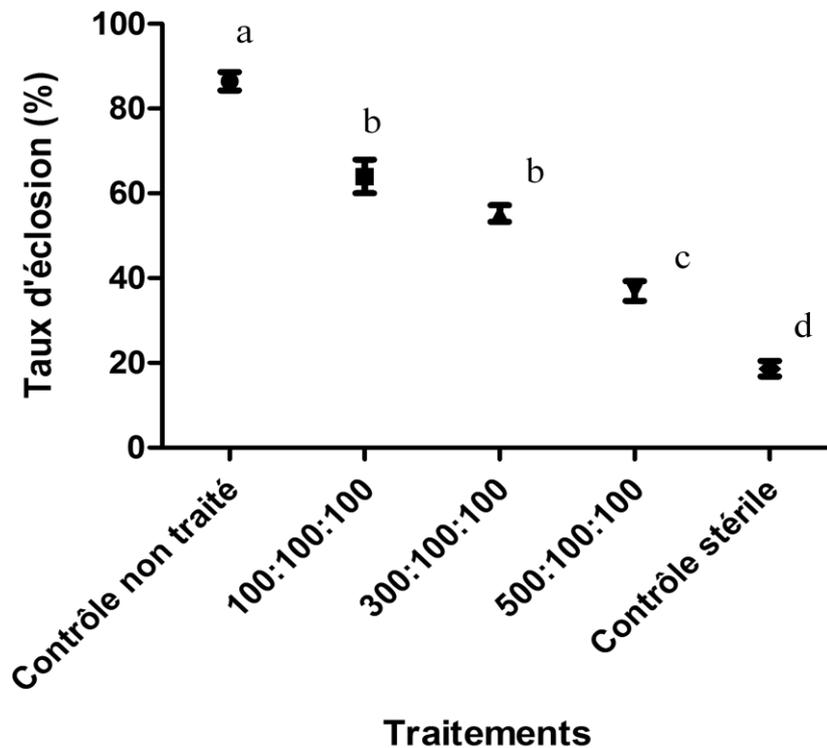


Figure 45 : Le taux d'éclosion des œufs en fonction des ratios et des contrôles stérile et non traités

4.3.2. Influence du temps de contact entre les mâles et les femelles

Le nombre de jours d'exposition aux partenaires et le ratio mâles stériles: mâles non traités ont eu un effet significatif sur le taux d'insémination (TRL $\chi^2=16,66$; $df=1$, $P=0,001$ et TRL $\chi^2=19,53$; $df=2$, $P=0,001$ respectivement; Tableau IX). Le taux d'insémination était significativement plus élevé avec le ratio 500: 100: 100 par rapport aux contrôles stérile et non traités à la fois (test *Posthoc* de Tuckey: $Z = 5,03$; $P<0,001$ et $Z=4,45$; $P<0,001$ respectivement; Tableau IX). Ce qui est en conformité avec les résultats de la première expérience.

Le nombre de jours d'exposition n'a eu aucun effet sur le taux d'éclosion (TRL $\chi^2=2,82$; $df=1$; $P=0,09$; Tableau IX).

Tableau IX : Taux d'insémination et d'éclosion en fonction du temps de contact entre les mâles et les femelles

Durée du contact	Contrôle stérile		500:100 :100		Contrôle non traité		
	1 jour	2 jours	1 jour	2 jours	1 jour	2 jours	
TI ±SE	59,23±10,97	82,58±5,04	* 85,25±8,90	92,08±1,49	N 3	64,10±10,6 82,87±2,59	*
TE ±SE	27,24±6,39	24,68±4,82	N 43,37±6,02	38,40±6,45	N 18	90,07±1,61 88,09±3,18	N S

TI= taux d'insémination, TE=taux d'éclosion, SE= erreur standard, NS = non significatif et * $P < 0,05$ entre jours.

4.4. Discussion

L'irradiation afin de stériliser les mâles a eu un effet sur la capacité des mâles d'*An. coluzzii* à compétir pour l'accouplement dans les grandes cages, en serre expérimentale. L'index de compétitivité estimé selon Fried (1971) a montré que les mâles stériles étaient à moitié aussi compétitifs que les mâles non traités en situation de compétition pendant deux nuits. De nombreuses études ont montré que la baisse de la compétitivité des mâles est due à l'irradiation (Benedict et Robinson, 2003; Andreasen et Curtis, 2005; voir aussi tableau 2 dans Helinski *et al.* 2006). Cette réduction de la compétitivité s'explique par une baisse de la survie, de la capacité à s'accoupler ou du stock de sperme (Helinski *et al.* 2008; Oliva *et al.* 2012; Damiens *et al.* 2013a). Cependant, le fait que les différences dans la compétitivité soient plus visibles dans les grandes cages et sur le terrain par rapport aux petites cages (Ignatowicz *et al.* 1994), laisse suggérer que d'autres paramètres pourraient être influencés par l'irradiation notamment la capacité de vol, la capacité de détecter et d'inséminer les femelles.

Dans cette étude, le taux d'insémination des mâles stériles était significativement plus bas par rapport aux mâles non traités. Cela a été observé en situation de non compétition directe, suggérant que ces mâles étaient incapables de trouver les femelles. L'irradiation est aussi connue pour réduire la vitesse de la marche chez les scarabées et les coléoptères adultes (Ignatowicz *et al.* 1994). Elle accroît aussi la période d'inactivité chez les mouches de fruits

Bactrocera tryoni (Weldon *et al.* 2010) et modifie considérablement la structure fibrillaire des muscles du vol chez *Musca domestica* (Bhakthan et Nair 1972). En situation de compétition, ces dommages somatiques pourraient être très défavorables aux mâles stériles. En effet, il est connu que dans les essaims se passe une compétition intense entre mâles pour féconder les femelles. Diabaté *et al.* (2011) ont montré que les essaims d'*An. gambiae* sont semblables à des arènes ('lek') ayant les caractéristiques d'une 'ruée' à la compétitivité sexuelle. Divers modèles qui se rapprochent des arènes ont été décrits, et le modèle 'hotshot' (champion) stipule que les mâles ne sont pas égaux (Diabaté *et al.* 2011). Dans ce modèle, les 'champions' attirent les femelles et les moins nantis positionnés aux alentours profitent pour féconder ces femelles. Cela sous-entend que les mâles stériles pourraient être considérés comme des 'mâles de mauvaise qualité' incapables d'inséminer le maximum de femelles. Andreasen et Curtis (2005) ont également remarqué un coût de la stérilisation sur la fitness des espèces d'anophèles, indiquant que certains mâles stériles subissent un retard dans la participation aux essaims et/ou sont même incapables d'initier l'essaimage. Cette incapacité à se joindre à un essaim pourrait entraîner une différence dans le taux d'insémination des femelles par les mâles stériles. Des observations similaires ont été faites chez les moustiques *An. arabiensis* stériles pendant sept jours avec des femelles en grandes cages comparativement aux petites cages (Helinski et Knols, 2008). Cela démontre clairement l'importance de la compétitivité des mâles stériles dans les grandes cages dans tout programme de contrôle génétique.

Pour pallier la baisse de la compétitivité due à l'irradiation, le lâcher d'un ratio mâles stériles: mâles non traités largement en faveur des stériles a été proposé lors des campagnes de suppression de populations de vecteurs (Dame *et al.* 2009). Par contre une réduction de la dose d'irradiation appliquée afin de minimiser l'impact sur la compétitivité des mâles induirait une faible stérilité. Ainsi dans les programmes d'éradication, un équilibre doit être trouvé entre le niveau de stérilité induite souhaité et le ratio de lâcher qui puisse compenser la baisse de compétitivité (Knipling, 1955; Andreasen et Curtis, 2005). Dans cette étude, les taux d'insémination et d'éclosion ont été fortement influencés par le ratio mâles stériles : mâles non traités, signifiant que l'augmentation du nombre de mâles stériles pourrait avoir un impact significatif sur les populations de vecteurs. En effet, le ratio 500: 100: 100 a montré une meilleure stérilisation de la population, quoique le niveau de stérilité observé dans le groupe contrôle stérile n'a pas été atteint. Ce qui signifie qu'un ratio de lâcher supérieur à 5:1 pourrait être nécessaire pour parvenir à l'éradication de la population. Ces variations de compétitivité

entre les ratios pourraient être dues à plusieurs facteurs, notamment les différences individuelles du niveau de stérilité des mâles. Il a été montré que le niveau de stérilité peut être lié à l'âge des pupes et la dose reçue au moment de l'irradiation (Helinski et Knols, 2006). Selon les mêmes auteurs, en grandes cages, la réduction de la capacité des mâles partiellement irradiés à l'état de pupes, pouvait être surmontée en augmentant de trois fois plus d'irradiés que de non irradiés.

Les mâles stériles d'*An. quadrimaculatus* irradiés aux rayons Gamma n'étaient pas aussi compétitifs que les mâles non irradiés au laboratoire (Patterson *et al.* 1968). Cependant, une augmentation du ratio mâles stériles : mâles non traités respectivement de 6:1 à 10:1 a engendré une baisse du taux d'éclosion de plus de 80%. D'autres études ont montré que, pour une stérilisation complète, le niveau d'irradiation doit être plus élevé (Andreasen et Curtis, 2005). Cependant, plus la dose est élevée, plus importante sera la perte en compétitivité et donc plus de mâles stériles (Knipling, 1955) seront nécessaires pour avoir un impact sur les populations sauvages. Un test de la compétitivité sur le terrain avec la souche *An. albimanus* a donné un index compris entre 0,78 et 0,80 (Patterson *et al.* 1968). Plus récemment, Yamada *et al.* (2014) ont montré dans une étude sur la compétitivité sexuelle des mâles d'*An. arabiensis* irradiés avec 75 Gy, qu'un ratio de 10:1 a permis d'induire une stérilité de 81% dans la population de femelles en grandes cages. La même étude a conduit à un index de compétitivité de 0,53 pour les ratios 5:1 et 10:1.

Chez *An. coluzzii*, le nombre de jours de contact entre les mâles et les femelles n'a pas influencé le taux d'éclosion selon notre design expérimental. Cela pourrait indiquer que le taux d'éclosion étant lié à la proportion d'œufs stériles ou fertiles, la proportion de mâles stériles et non traités qui se sont accouplés au cours de la première nuit était significativement élevée comparativement à la deuxième nuit. Dans le ratio 500: 100: 100 , le taux d'insémination ne change pas en fonction du temps de contact. Par conséquent, sur le plan pratique, cela permettra de gagner en temps. Ainsi, un jour serait suffisant pour faire un test de compétitivité dans les grandes cages d'autant plus que la mortalité sera plus faible et l'expérience plus rapide à effectuer.

Le point principal est que pour la TIS, le coût de la stérilisation doit être soit compensé par des ratios de lâchers élevés soit minimisé en réduisant la dose d'irradiation, afin de maximiser l'efficacité de la technique (Parker et Mehta, 2007).

4.5. Conclusion partielle

Nous avons montré que l'irradiation affecte la capacité d'accouplement des mâles d'*An. coluzzii* dans les grandes cages, en serre expérimentale. Notre étude a aussi montré que les mâles stériles étaient à moitié aussi compétitifs que les mâles non traités en situation de compétition pendant deux nuits. Selon notre design expérimental, le nombre de jours de contact entre les mâles et les femelles d'*An. coluzzii* n'a pas influencé le taux d'éclosion.

D'autres essais dans des conditions de terrain avec les mâles et femelles sauvages ou récemment colonisés devraient être entrepris afin d'estimer le ratio de mâles stériles: mâles sauvages nécessaire pour produire un impact sur les populations sauvages. Afin de déterminer quand une femelle s'est accouplée avec un mâle non traité ou avec un mâle stérile, le marquage des mâles avec des isotopes stables permettra de déterminer clairement l'origine des spermatozoïdes transférés aux femelles. Cela pourrait faciliter l'investigation relative au succès d'accouplement en fonction du temps de contact.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail vise à apporter des connaissances sur la bio-écologie des mâles d'*An. gambiae* s.l. à même de contribuer au développement de méthodes alternatives innovantes et complémentaires de lutte contre les vecteurs du paludisme. Il s'agissait pour cela, d'investiguer tout d'abord les facteurs écologiques et physiologiques liés au comportement et au succès reproducteur des mâles en milieu naturel, ensuite à optimiser le système d'élevage des anophèles en laboratoire, répondant aux critères de sélection rencontrés en milieu naturel et enfin à évaluer les conséquences d'une méthode de stérilisation des mâles élevés au laboratoire sur leur niveau de compétitivité sexuelle.

Les travaux de terrain ont montré que l'essaimage des mâles d'*An. coluzzii* et d'*An. gambiae* consomme une proportion significative des réserves énergétiques principalement les sucres totaux et le glycogène. Cependant, il faut noter que les réserves énergétiques ne différenciant pas entre les mâles accouplés et non accouplés, la question reste posée et mérite d'être approfondie avec un meilleur protocole d'échantillonnage. L'investigation sur les critères à même de définir le succès à l'accouplement a révélé, sur nos deux sites d'échantillonnage, que les mâles accouplés chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* étaient en moyenne significativement plus grands que les mâles non accouplés. Toutefois, la taille de ces mâles accouplés se situait autour d'une valeur centrale intermédiaire, suggérant que l'agilité dans le vol pourrait également jouer un rôle important dans le succès de l'accouplement. Enfin, notre outil de mesure n'a pas pu différencier significativement si les mâles en couples étaient plus symétriques que les mâles non accouplés. Il en est de même concernant l'hypothèse sur l'accouplement assortatif entre mâles et femelles d'une même espèce.

L'évaluation de l'impact du régime alimentaire sur les paramètres de développement des larves d'*An. coluzzii* a révélé que la nature et la quantité de la nourriture larvaire ont une influence significative sur le temps de développement larvaire, le taux d'émergence et la taille des adultes à l'émergence. Par contre, une augmentation de la densité larvaire du milieu tend à produire un effet inverse sauf si celle-ci est accompagnée par une augmentation de la quantité de nourriture disponible dans le milieu. En effet, il existe d'importantes interactions entre chacune de ces variables de sorte que l'obtention d'un développement optimisé des larves n'est pas forcément la résultante des valeurs extrêmes des variables du milieu mais plutôt celles de valeurs modérément élevées. Des 4 diètes testées, la diète 2 (composée de poudre de thon, de poudre de foie de bovin, de levure et du complexe de vitamines) semble se dégager du lot et serait le régime idéal qui associe les meilleurs facteurs d'un développement optimisé

pour l'élevage d'*An. coluzzii*. Ainsi, le système d'élevage devrait permettre une production de milliers de moustiques pour une production massive d'œufs et de mâles suffisamment compétitifs à lâcher dans le cadre de la lutte génétique.

Dans la présente étude, une rapide et efficace méthode de collecte des œufs et de quantification sans affecter la qualité des œufs a été développée sur le modèle *An. arabiensis*. Cette méthode développée à partir de l'élevage à petite échelle d'anophèles a été pour la première fois appliquée sur les cages de production de masse de l'AIEA. Du fait des débris collectés en même temps que des œufs des cages de production de masse, le poids de ces œufs nécessite un ajustement afin de corriger le nombre réel d'œufs / plateau nécessaire à l'élevage de masse. Cette méthode a permis une distribution uniforme des œufs dans les plateaux du rack de production de masse de larves et pupes. Un rendement de 50% de production de pupes du rack, avec un étalement de la pupaison maximale sur trois jours a été obtenu pour la première fois. Les moustiques élevés dans ces conditions réelles de production de masse ont généré en moyenne 30 000 œufs/jour/cage les quatre premiers jours conduisant à une production hebdomadaire d'environ 200 000 œufs/ cage. C'est une importante étape vers le développement d'une chaîne de production de masse et de stérilisation de mâles en vue de l'application de la lutte génétique comportant un volet TIS contre les vecteurs du paludisme.

Après avoir testé une méthode de stérilisation des mâles, notre étude a montré que l'irradiation affecte la capacité d'accouplement des mâles d'*An. coluzzii* dans les grandes cages en serre expérimentale. Au bout de deux nuits d'expérimentation, en compétition pour des femelles, les mâles stérilisés avec une dose partielle de 90Gy étaient à moitié aussi compétitifs que les mâles non traités. Cependant cette dose n'a pas induit une stérilité efficace (>99,9%). Chez *An. coluzzii*, le nombre de jours de contact entre les mâles et les femelles n'a pas influencé le taux d'éclosion selon notre design expérimental, suggérant que les tests de compétitivité d'*An. coluzzii* pourraient s'opérer en une nuit.

Cette thèse a traité différents points clés pour le développement d'une lutte génétique en investiguant sur différentes espèces vectrices majeures du paludisme en Afrique tropicale (*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabienis*). Il serait cependant nécessaire de vérifier si les résultats développés sur l'une des espèces s'appliquent aux autres. Cela permettra de mettre à profit ces résultats trouvés en fonction de l'espèce ciblée et des réalités pratiques sur le terrain afin de proposer un guide pour les futurs essais pilotes de lutte génétique contre le paludisme.

Cependant, d'autres perspectives se dégagent à nous à savoir :

- approfondir la recherche sur d'autres critères associés au succès d'accouplement en investiguant sur le rôle des phéromones, des signaux acoustiques liés aux battements des ailes et le rôle de la vision dans l'essaimage. Il serait utile d'étendre cette étude en saison sèche et dans différents faciès écologiques afin de percer le secret de l'essaimage et la reproduction des mâles.

- développer un régime alimentaire riche en glucides. Ce régime larvaire devrait non seulement fournir aux mâles une taille modérée (idéale) et des réserves suffisantes (acquises aux stades larvaire et adulte) pour l'essaimage et l'accouplement mais aussi être abordable et disponible localement afin de minimiser les coûts de production en masse.

- développer une méthode de synchronisation de l'éclosion des œufs afin d'espérer une parfaite synchronisation de la nymphose.

- développer une méthode de séparation des sexes au stade des œufs, des larves ou des pupes, afin d'optimiser la méthode d'élevage de masse et le lâcher exclusif de mâles.

- développer une méthode de séparation des larves et pupes afin de faciliter le processus de production de masse

- développer une méthode de stérilisation, voire de contrôle de la qualité des moustiques produits en masse, stérilisés et lâchés en milieu semi-naturel. Il est donc important de trouver le meilleur équilibre entre un taux de stérilité efficace et une compétitivité des mâles stériles auprès des femelles sauvages. L'utilisation des radio-protectants capables de préserver la compétitivité des mâles irradiés avec des doses élevées doit être évaluée.

- tester les mâles stériles dans les conditions de terrain dans la malaria-sphère (Knols *et al.* 2002) avec les mâles et femelles sauvages ou récemment colonisés pourraient être entrepris afin d'estimer le ratio de mâles stériles: mâles sauvages nécessaire pour produire un impact sur les populations sauvages.

- déterminer la dynamique de l'accouplement des mâles stériles par le marquage des mâles avec des isotopes stables permettra de mieux déterminer l'origine des spermatozoïdes transférés aux femelles (quand une femelle s'est accouplée avec un mâle non traité ou avec un mâle stérile) et pourrait indiquer le moment idéal et la fréquence des lâchers.

- tester la survie et la dispersion des mâles stériles comparativement aux mâles sauvages par des essais de marquage- lâcher-recapture en milieu naturel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodríguez MH, Sinden H, Slutsker L et Tanner M. A research agenda to underpin malaria eradication. PLoS Med. 2011; 8: e1000406.
- Alphey L, Beard CB, Billingsley P, Coetzee M, Crisanti A, Curtis C, Eggleston P, Godfray C, Hemingway J, Jacobs-Lorena M, James AA, Kafatos FC, Mukwaya LG, Paton M, Powell JR, Schneider W, Scott TW, Sina B, Sinden R, Sinkins S, Spielman A, Touré Y et Collins FH. Malaria control with genetically manipulated insect vectors. Science. 2002; 298: 119 - 21.
- Andreasen MH et Curtis CF. Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. Med Vet Entomol. 2005; 19:238-244.
- Bailey DL, Thomas JA, Munroe WL et Dame DA. Viability of eggs of *Anopheles albimanus* and *Anopheles quadrimaculatus* when dried and stored at various temperatures. Mosq News. 1979; 39: 113 – 116.
- Baldet T, Diabaté A et Guiguemdé RT. La transmission du paludisme dans la zone rizicole de la vallée du Kou (Bama), (Burkina Faso). Cahiers Santé. 2003; 13: 55 - 60.
- Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Robert Shaw W, Dabiré RK, Diabaté A, Levashina EA et Catteruccia F. Evidence of natural Wolbachia infections in field populations of *Anopheles gambiae*. Nat Commun. 2014; 5: 3985
- Balestrino F, Gilles JR, Soliban SM, Nirschl A, Benedict QE et Benedict MQ. Mosquito mass-rearing technology: a cold-water vortex device for continuous unattended separation of *Anopheles arabiensis* pupae from larvae. J Am Mosq Control Assoc. 2011; 27: 227 – 235.
- Balestrino F, Benedict M et Gilles J. A new larval tray and rack system for improved mosquito mass-rearing. J Med Entomol. 2012; 49: 595 – 605.
- Balestrino F, Puggioli A, Bellini R, Petric D et Gilles JRL. Mass Production Cage for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2014; 51: 155 - 163.
- Bargielowski I, Alphey L et Koella JC. Cost of Mating and Insemination Capacity of a Genetically Modified Mosquito *Aedes aegypti* OX513A Compared to Its Wild Type Counterpart. PLoS ONE. 2011; 6: e26086.

- Bargielowski I, Kaufmann C, Alphey L, Reiter P et Koella J. Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12: 1053 - 1058.
- Beier JC, Copeland R, Oyaro C, Masinya A, Odago WO, Oduor S, Koech DK et Roberts CR. *Anopheles gambiae* complex egg-stage survival in dry soil from larval development sites in western Kenya. *J. Am. Mosq Control Assoc.* 1990; 6: 105 - 109.
- Beier JC, Keating J, Githure JJ, Macdonald MB, Impoinvil DE et Novak RJ. Integrated vector management for malaria control. *Malar J.* 2008; 7 Suppl 1:S4.
- Bellows TSJ. The descriptive properties of some models for density dependence. *J Anim Ecol.* 1981; 50: 139 - 56.
- Benedict MQ et Robinson AS. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol.* 2003; 19: 349 - 355.
- Benedict MQ, Hood-Nowotny RC, Howell PI et Wilkins EE. Methylparaben in *Anopheles gambiae s.l.* sugar meals increases longevity and malaria oocyst abundance but is not a preferred diet. *J Insect Physiol.* 2009a; 55: 197 - 204.
- Benedict MQ, Knols BGJ, Bossin HC, Howell PI, Mialhe E, Caceres C et Robinson AS. Colonisation and mass rearing: learning from others. *Malar J.* 2009b; 8: S4.
- Bhakthan NMG et Nair KK. Fine structural damage in the somatic tissues of gamma-irradiated house fly. 1. Flight muscles. *Ann Entomol Soc Am.* 1972; 65: 504 - 508.
- Blanford S, Chan BH, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF et Thomas MB. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science.* 2005; 308: 1638 - 41.
- Briegel H. Fecundity, Metabolism and Body Size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), Vectors of Malaria. *J Med Entomol.* 1990; 27: 839 - 850.
- Briegel H. Physiological bases of mosquito ecology. *J Vector Ecol.* 2003; 28: 1 - 11.
- Briegel H, Knusel I et Timmermann SE. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *J Vector Ecol.* 2001; 26: 21 - 31.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC et Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature.* 2000; 405: 959 - 962.

- Catteruccia F, Crisanti A et Wimmer EA. Transgenic technologies to induce sterility. *Malar J.* 2009; 8: Suppl 2 - S7.
- Chambers GM et Klowden MJ. Age of *Anopheles gambiae* Giles male mosquitoes at time of mating influences female oviposition. *J Vector Ecol.* 2001; 26: 196 - 201.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P et Guillet P. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia.* 1999; 41: 319 - 322.
- Charlwood JD et Jones MDR. Mating behaviour in the mosquito, *Anopheles gambiae s.l.*. I. Close range and contact behavior. *Physiol Entomol.* 1979; 4: 111 - 120.
- Charlwood JD, Pinto J, Sousa CA, Ferreira C et Do Rosario VE. Male size does not affect mating success (of *Anopheles gambiae* in Sao Tomé). *Med Vet Entomol.* 2002; 16: 109 - 113.
- Christophides GK. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cell Microbiol.* 2005; 3: 325 - 333.
- Clements AN. *The Biology of Mosquitoes Development Nutrition and Reproduction.* 1992; New York: Chapman and Hall.
- Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Sensory Reception and Behaviour.* 1999; Vol. 2. CABI Publishing, U.K.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Torre AD, Coulibaly MB et Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa.* 2013; 3619: 246 – 274.
- Cohuet A, Simard F, Wondji CS, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P et Fontenille D. High Malaria Transmission Intensity Due to *Anopheles funestus* (Diptera:Culicidae) in a Village of Savannah–Forest Transition Area in Cameroon. *J. Med. Entomol.* 2004; 41: 901 - 905.
- Coluzzi M, Petrarca V et Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di Zoologia.* 1985; 52: 45 - 63.
- Crompton B, Thomason JC et McLachlan A. Mating in a viscous universe: the race is to the agile, not to the swift. *Proc Biol Sci.* 2003; 270: 1991 - 1995.

- Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, Toé KH, Ouari A, Kengne P, Bass C et Baldet T. 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.* 2009; 103: 1113 - 1120.
- Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, Djogbenou L, Wondji C, Chandre F, Simard F, Ouédraogo JB, Martin T, Weill M et Baldet T. Trends in Insecticide Resistance in Natural Populations of Malaria Vectors in Burkina Faso, West Africa: 10 Years' Surveys. In: *Insecticides-Pest Engineering*. Edited by Perveen F. Croatia. InTech. 2012; 479 - 502.
- Dabiré KR, Baldet T, Diabaté A, Dia I, Costantini C, Cohuet A, Guiguemdé TR et Fontenille D. *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticides resistance status and role in malaria transmission. *J Med Entomol.* 2007; 44: 990 – 997.
- Dame DA et Curtis CF. The potential use of the sterile insect technique and other genetic control methods for control of malaria-transmitting mosquitoes. 1996; pp: 1 - 27. IAEA, Vienna.
- Dame DA, Curtis CF, Benedict MQ, Robinson AS et Knols BGJ. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malar J.* 2009; 8: S2.
- Dame DA, Lofgren CS, Ford HR, Boston MD, Baldwin KF et Jeffery GM. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador II. Methods of rearing, sterilization, and distribution. *Am J Trop Med Hyg.* 1974; 23: 282 - 287.
- Dame DA, Woodard DB, Ford HR et Weidhaas DE. Field behavior of sexually sterile *Anopheles quadrimaculatus* males. *Mosq News.* 1964; 24: 6 - 14.
- Dame DA, Haile DG, Lofgren CS, Baily DL et Munroe WL. Improved rearing techniques for larval *Anopheles albimanus*: use of dried mosquito eggs and electric heating tapes. *Mosq News.* 1978; 38: 68 – 73.
- Dame DA, Lowe RE et Williamson DL. Assessment of released sterile *Anopheles albimanus* and *Glossina morsitans morsitans*. In *Cytogenetics and genetics of vectors*. Edited by Pal R., J, Kitzmiller, T. A. Kanda. Netherlands: 1981; Elsevier Biomedical: 231 – 248.

- Damiens D, Benedict MQ, Wille M et Gilles JRL. An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): Eat like a horse, a bird or a fish? J Med Entomol. 2012; 49: 1001 - 1011.
- Damiens D, Vreysen MJB et Gilles JRL. *Anopheles arabiensis* sperm production after genetic manipulation, dieldrin treatment, and irradiation. J Med Entomol. 2013a; 50: 314 – 316.
- Damiens D, Soliban SM, Balestrino F, Alsir R, Vreysen MJ et Gilles JR. Different blood and sugar feeding regimes affect the productivity of *Anopheles arabiensis* colonies (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2013b; 50: 336 - 43.
- Dao A, Adamou A, Yaro AS, Alpha SY, Hamidou MM, Kassogue Y, Traore SF et Lehmann T. Assessment of alternative mating strategies in *Anopheles gambiae*: Does mating occur indoors? J Med Entomol. 2008; 45: 643 - 652.
- Dao A, Kassogue Y, Adamou A, Diallo M, Yaro AS, Traore SF et Lehmann T. Reproduction-longevity trade-off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2010; 47: 769 - 77.
- Davidson G, Odetoynbo JA, Colussa B et Coz J. A field attempt to assess the mating competitiveness of sterile males produced by crossing 2 member species of the *Anopheles gambiae* complex. Bull. World Health Org. 1970; 42: 55 - 67.
- della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V et Coluzzi M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae s.s.* in west Africa. Insect Mol Biol. 2001; 10: 9 – 18.
- Dembo E, Ogboi J, Abay S, Lupidi G, Dahiya N, Habluetzel A et Lucantoni L. A User Friendly Method to Assess *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) Vector Fitness: Fecundity. J Med Entomol. 2014; 51: 831 - 836.
- Detinova T. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. World Health Organisation, Monogr Series. 1962; 47: 216p.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Darriet F, Brengues C, Guiguemdé TR, Guillet P, Hemingway J et Hougaard JM. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67: 617 - 622.

- Diabaté A, Baldet T, Brengues C, Kengne P, Dabire KR, Simard F, Chandre F, Hougard JM, Hemingway J, Ouedraogo JB et Fontenille D. Natural swarming behaviour of the molecular form of *Anopheles gambiae*. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97: 713 - 716.
- Diabaté A, Dabiré RK, Kim Eun H, Dalton R, Millogo N, Baldet T, Simard F, Gimnig EJ, Hawley AW et Lehman T. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol.* 2005; 42: 548 - 553.
- Diabaté A, Dabire KR, Kengne P, Brengues C, Ouari A, Simard F et Lehmann T. Mixed swarm of the molecular form M and S form of *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol.* 2006; 43: 480 - 483.
- Diabaté A, Dabiré RK, Heidenberger K, Crawford J, Lamp WO, Culler LE et Lehmann T. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evol Biol.* 2008; 8: 5
- Diabaté A, Dao A, Yaro A, Adamaou A, Gonzalez R, Manoukis N, Traore SF, Gwadz B et Lehmann T. Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proc R Soc Lond B.* 2009; 276: 4215 - 4222.
- Diabaté A, Yaro AS, Dao A, Diallo M, Huestis DL et Lehmann T. Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evol Biol.* 2011; 11: 184.
- Diabaté A, Bilgo E, Dabiré RK et Tripet F. Environmentally friendly tool to control mosquito populations without risk of insecticide resistance: the Lehmann's funnel entry trap. *Malar J.* 2013; 12: 196.
- Diop A, Faye O et Molez JF. Mise en place en insectarium d'une souche d'*Anopheles arabiensis* (Diptera : Culicidae). *Entomologie médicale*, manuscrite.1998; n°1917.
- Dyck A, Hendrichs J et Robinson AS. *The Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* Springer, Dordrecht. 2005.
- Ferguson HM, John B, Ng'habi K et Knols BGJ. Redressing the sex imbalance in knowledge of vector biology. *Trends Ecol Evol.* 2005; 20: 202 - 209.
- Fernandes L et Briegel H. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol.* 2005; 30: 11 - 26.

- Fontenille D et Simard F. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 357 - 375.
- Foster WA. Mosquito sugar feeding and reproductive energetic. *Ann Rev Entomol.* 1995; 40: 443 – 474.
- Foster WA et Takken W. Nectar-related vs human-related volatiles: behavioural response and choice by female and male *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) between emergence and first feeding. *Bull Entomol Res.* 2004; 94: 145 - 157.
- Fried M. Determination of sterile-insect competitiveness. *J Econ Entomol.* 1971; 64: 869 - 872.
- Gabrieli P, Kakani EG, Mitchell SN, Mameli E, Want EJ, Mariezcurrena Anton A, Serrao A, Baldini F et Catteruccia F. Sexual transfer of the steroid hormone 20E induces the postmating switch in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 18: 111: 16353 - 8.
- Gary RE, Cannon JW et Foster WA. Effect of sugar on male *Anopheles gambiae* mating performance, as modified by temperature, space, and body size. *Parasit Vector.* 2009; 2: 19.
- Gilles JR, Lees RS, Soliban SM et Benedict MQ. Density-dependent effects in experimental larval populations of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) can be negative, neutral, or overcompensatory depending on density and diet levels. *J Med Entomol.* 2011; 48: 296 - 304.
- Gillies MT et Meillon BD. The Anophelinae of Africa South of the Sahara, Johannesburg: South African Institute for Medical Research (Ethiopian Zoogeographical Region) *Publ S Afr Inst Med Res.* 1968; 54: 1 - 343.
- Ginnig JF, Ombok M, Otieno S, Kaufman MG, Vulule JM et Walker ED. Density-dependant development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. *J Med Entomol.* 2002; 39: 162 - 72.
- Gouagna LC, Poueme RS, Dabiré KR, Ouedraogo JB, Fontenille D et Simard F. Pattern of sugar feeding and host plant preferences in adult males of *An. gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol.* 2010; 35: 267 - 276.

- Gu W, Müller G, Schlein Y, Novak RJ et Beier JC. Natural plant sugar sources of *Anopheles* mosquitoes strongly impact malaria transmission potential. PLoS ONE. 2011; 6: e15996.
- Helinski MEH, Parker AG et Knols BG. Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. Malar J. 2006; 5: 41.
- Helinski MEH et Knols BGJ. Mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* mosquitoes irradiated with a partially or fully sterilizing dose in small and large laboratory cages. J Med Entomol. 2008; 45: 698 - 705.
- Helinski MEH et Knols BG. The influence of late-stage pupal irradiation and increased irradiated: un-irradiated male ratio of mating competitiveness of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* Patton. Bull Entomol Res. 2009; 99: 317 - 322.
- Helinski MEH, Parker AG et Knols BGJ. Radiation biology of mosquitoes. Malar J. 2009; 8: S2.
- Howell PI et Knols BGJ. Male mating biology. Malar J. 2009; 12: S18.
- Huestis DL, Yaro AS, Traoré AI, Adamou A, Kassogué Y, Diallo M, Timbiné S, Dao A et Lehmann T. Variation in metabolic rate of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in a Sahelian village. J Exp Biol. 2011; 214: 2345 - 2353.
- Huho BJ, Ng'habi K, Killeen GF, Nkwengulila G, Knols BGJ et Ferguson HM. A reliable morphological method to assess the age of male *Anopheles gambiae*. Malar J. 2006; 5: 26.
- Huho BJ, Ng'habi KR, Killeen GF, Nkwengulila G, Knols BGJ et Ferguson HM. Nature beats nurture: a case study of the physiological fitness of free-living and laboratory-reared male *Anopheles gambiae* s.l. J Exp Biol. 2007; 210: 2939 - 2947.
- Ignatowicz S, Wesolowska B et Zaedee IH. Detection of irradiated insect pests in stored products: locomotor activity of irradiated adult beetles. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection, 17-23 April 1994; Canberra, Australia. CAB International, Wallingford, UK: 1994; 1209 - 1213.
- Impoinvil DE, Cardenas GA, Githure JI, Mbogo CM et Beier JC. Constant temperature and time period effects on *Anopheles gambiae* egg hatching. J Am Mosq Control Assoc. 2007; 23: 124 - 130.

- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA et Jacobs-Lorena M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*. 2002; 417: 452 - 455.
- Juliano SA. Population dynamics. *J Am Mosq Control Assoc*. 2007; 23: 265 - 75. Kaiser PE, Bailey DL et Lowe RE. Release strategy evaluation of sterile males of *Anopheles albimanus* with competitive mating. *Mosq News*. 1981; 41: 60 - 66.
- Kamareddine L. The Biological Control of the Malaria Vector. *Toxins*. 2012; 4: 748 - 767.
- Khan I, Damiens D, Soliban SM et Gilles JRL. Effects of drying eggs and egg storage on hatchability and development of *Anopheles arabiensis*. *Malar J*. 2013; 12: 318.
- Killeen GF, Fillinger U, Kiche I, Gouagna LC et Knols BG. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *Lancet Infect Dis*. 2002; 10: 618-27.
- Klassen W. Introduction: development of the sterile insect technique for African malaria vectors. *Malar J*. 2009; 8: 11.
- Knipling EF. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J Econ Entomol*. 1955; 48: 459 - 469.
- Knipling EF, Laven H, Craig GB, Pal R, Smith CN et Brown AWA. Genetic control of insects of public health importance. *Bull World Health Organ*. 1968; 38: 421 - 438.
- Knols BGJ, Njiru BNN, Mathenge EM, Mukabana WR, Beier JC, et Killeen GF. Malariasphere: A greenhouse-enclosed simulation of a natural *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) ecosystem in Western Kenya. *Malar J*. 2002; 1:19.
- Lehmann T, Dalton R, Kim EH, Dahl E, Diabaté A, Dabiré R et Dujardin JP. Genetic contribution to variation in larval development time, adult size, and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. *Infect Genet Evol*. 2006; 6:410 - 416.
- Lindquist DA, Abusowa M et Klassen W. Eradication of the new world screwworm from the Libyan Arab Jamahiriya. In *Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques*. Edited by IAEA/FAO. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency (IAEA). 1993; 319 - 330.

- Lyimo EO, Takken W et Koella JC. Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. Entomol Exp Appl. 1992; 63: 265 - 271.
- Lyimo E et Takken W. Effects of adult body size on fecundity and the pre-gravid rate of *Anopheles gambiae* females in Tanzania. Med Vet Entomol. 1993; 7: 328 – 360.
- Mackenzie A, Reynolds JD, Brown VJ et Sutherland WJ. Variation in male mating success at leks. Amer Nat. 1995; 145: 633 - 652.
- Madakacherry O, Lees RS et Gilles JRL. *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: release ratios and mating competitiveness. Acta Trop. 2014; 132S: 124S - 129S.
- Maïga H, Dabiré RK, Lehmann T, Tripet F et Diabaté A. Variation in Energy Reserves and Role of Body Size in the Mating System of *Anopheles gambiae*. J Vector Ecol. 2012; 37: 289 - 297.
- Mains JW, Mercer DR et Dobson SL. Digital image analysis to estimate numbers of *Aedes* eggs oviposited in containers. J Am Mosq Control Assoc. 2008; 24: 496 - 501.
- Manda H, Gouagna LC, Nyandat E, Kabiru EW, Jackson RR, Foster WA, Githure JI, Beier JC et Hassanali A. Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. on endemic plants in western Kenya. Med Vet Entomol. 2007; 21: 103 – 111.
- Marchand RP. A new cage for observing mating behavior of wild *Anopheles gambiae* in the laboratory. J Am Mosq Control Assoc. 1985; 1: 234 - 236.
- McLachlan A et Cant M. Small males are more symmetrical: mating success in the midge *Chironomus plumosus* (Diptera Chironomidae). Anim Behav. 1995; 50: 841 - 846.
- Mendis K, Rietveld A, Warsame M, Bosman A, Greenwood B et Wernsdorfer WH. From malaria control to eradication: the WHO perspective. Trop Med Int Health. 2009; 14: 802 – 809.
- Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin A, Chandre F, Djègbé I, Guis H et Corbel V. Changes in *Anopheles funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin. J Infect Dis. 2012; 206: 1622–9.
- Moiroux N, Damien GB, Egrot M, Djenontin A, Chandre F, Corbel V, Killeen GF et Pennetier C. Human Exposure to Early Morning *Anopheles funestus* Biting Behavior

- and Personal Protection Provided by Long-Lasting Insecticidal Nets. PLoS ONE. 2014; 9: e104967.
- Mollahosseini A, Rossignol M, Pennetier C, Cohuet A, Anjos AD, Chandre F et Shahbazkia HR. A user-friendly software to easily count *Anopheles* egg batches. Parasit Vectors. 2012; 5: 122.
- Mosqueira B, Chabi J, Chandre F, Akogbeto M, Hougard JM, Carnevale P et Mas-Coma S. Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in West Africa--part 2: field evaluation. Malar J. 2010; 9 : 341.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D et Sircoulon J. Biodiversité du paludisme dans le monde. Editions John Libbey Eurotex, ISBN. 2004; 2-7420-0452-1, 428p.
- Müller G et Schlein Y. Plant tissues: the frugal diet of mosquitoes in adverse conditions. Med Vet Entomol. 2005; 19: 413 – 422.
- Müller G et Schlein Y. Sugar questing mosquitoes in arid areas gather on scarce blossoms that can be used for control. Int J Parasitol. 2006; 36: 1077 - 1080.
- Namountougou M, Simard F, Baldet T, Diabaté A, Ouédraogo JB, Martin T et Dabiré KR. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso, West Africa. PLoS ONE. 2012; 7: e48412.
- Nayar JK et Van Handel E. The fuel for sustained mosquito flight. J Insect Physiol. 1971; 17: 471 - 481.
- Ng'habi K, John B, Nkwengulila G, Knols BGM, Killeen GF et Ferguson HM. Effect of larval crowding on mating competitiveness of *Anopheles gambiae* mosquitoes. Malar J. 2005; 4: 49.
- Ng'habi KR, Huho BJ, Nkwengulila G, Killeen GF, Knols BGJ et Ferguson HM. Sexual selection in mosquito swarms: may the best man lose? Anim Behav. 2008; 76: 105 - 112.
- N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, Koffi AA et Chandre F. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Med Vet Entomol. 2003; 17: 19 - 25.

- Okanda F, Dao A, Njiru B, Arija J, Akelo H, Touré Y, Odulaja A, Beier J, Githure J, Yan G, Gouagna LC, Knols BG et Killeen GF. Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malar J.* 2002; 1: 10.
- Oliva C, Maier M, Gilles J, Jacquet M, Lemperiere G, Quilici S, Vreysen M, Schooneman F, Chadee D et Boyer S. Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Aedes albopictus* (Skuse) under semi-field conditions on Reunion Island. *Acta Trop.* 2012; 125: 287 - 293.
- Papadopoulos NT, Liedo P, Muller HG, Wang JI, Molleman F et Carey LR. Cost of reproduction in male medflies: The privacy of sexual courting in extreme longevity reduction. *J Insect Physiol.* 2010; 56: 283 - 287.
- Parker A et Mehta K. Sterile insect technique: a model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Florida Entomol.* 2007; 90: 88 - 95.
- Pascini TV, Albeny DS, Ramalho-Ortigao M, Vilela EF, Serrao JE et Martins GF. Changes in the Fat Body during the Post-Embryonic Development of the Predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol.* 2011; 40: 456 - 461.
- Pates H et Curtis C. Mosquito behavior and vector control. *Annu Rev Entomol.* 2005; 50: 53 - 70.
- Paton D, Touré M, Sacko A, Coulibaly MB, Traoré SF et Tripet F. Genetic and Environmental factors associated with laboratory rearing affect survival and assortative mating but not overall mating success in *Anopheles gambiae sensu stricto*. *PLoS ONE.* 2013; 8: e82631.
- Patterson RS, Lofgren CS et Boston MD. The sterile male technique for control of mosquitoes: a field cage study with *Anopheles quadrimaculatus*. *Florida Entomol.* 1968; 51: 77 - 82.
- Pecharsky BL, McIntosh AR, Caudill CC et Dahl J. Swarming and mating behavior of mayfly *Baetis bicaudatus* suggest stabilizing selection for male body size. *Behav Ecol Sociobiol.* 2002; 51: 530 - 537.
- Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo WM, Kera-Hinzoumbe C, Yangalbe-Kalnone E, Sagnon N, Simard F et Coetzee M. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*:

- data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malar J.* 2009; 8: 299.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z et Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 2011; 27: 91 - 98.
- Reisen WK. Intraspecific competition in *Anopheles stephensi*. *Liston Mosq News.* 1975; 35: 473 - 82.
- Reisen WK, Baker RH, Sakai RK, Mahmood F, Rathor HR, Raana K et Toqir G. *Anopheles culicifacies* Giles: Mating behavior and competitiveness in nature of chemosterilized males carrying a genetic sexing system. *Ann Entomol Soc Am.* 1981; 74: 395 – 401.
- Reisen WK, Milby MM, Asman SM, Bock ME, Meyer RP, McDonald PT et Reeves WC. Attempted suppression of a semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recently colonized strain. *Mosq News.* 1982; 42: 565 – 575.
- Reisen WK. Lessons from the past: historical studies by the University of Maryland and the University of California, Berkeley. In: *Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes.* Edited by Takken, W., T. W. Scott. Wageningen: Kluwer Academic Publishers. 2003; Dordrecht: 25 - 32.
- Rivero A et Ferguson HM. The energetic budget of *Anopheles stephensi* infected with *Plasmodium chabaudi*: is energy depletion a mechanism for virulence? *Proc R Soc Lond B.* 2003; 270: 1365 – 1371.
- Rivero A, Agnew P, Bedhomme S, Sidobre C et Michalakis Y. Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. *Parasitology.* 2007; 134: 1355 - 1362.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V et Carnevale P. 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.* 1985; 65: 201 - 214.
- Robinson AS. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica.* 2002; 116: 5 - 13.

- Rogers DW, Baldini F, Battaglia F, Panico M, Dell A, Morris HR et Catteruccia F. Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. *PLoS Biol.* 2009; 7: e1000272.
- Sachs J et Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature.* 2002; 415: 680 - 685.
- Sawadogo SP, Diabaté A, Toé HK, Sanon A, Lefèvre T, Baldet T, Gilles J, Simard F, Gibson G, Sinkins S et Dabiré RK. Effects of Age and Size on *Anopheles gambiae s.s.* Male Mosquito Mating Success. *J Med Entomol.* 2013; 50: 285 - 295.
- Sawadogo PS, Namountougou M, Toé KH, Rouamba J, Maïga H, Ouédraogo KR, Baldet T, Gouagna LC, Kengne P, Simard F, Costantini C, Gibson G, Diabaté A, Lees RS, Gilles JR et Dabiré KR. Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop.* 2014; Apr; 132 Suppl: S42-52.
- Stone CM, Taylor RM, Roitberg BD et Foster WA. Sugar Deprivation Reduces Insemination of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), Despite Daily Recruitment of Adults, and Predicts Decline in Model Populations. *J Med Entomol.* 2009; 46: 1327 – 1337.
- Takken W. Chemical ecology of insect vectors: temporal, environmental and physiological aspects. *Trends Parasitol.* 2005; 21: 57.
- Tinto H, Valea I, Sorgho H, Tahita MC, Traore M, Bihoun B, Guiraud I, Kpoda H, Rouamba J, Ouédraogo S, Lompo P, Yara S, Kabore W, Ouédraogo JB, Guiguemdé RT, Binka FN et Ogutu B. The impact of clinical research activities on communities in rural Africa: the development of the Clinical Research Unit of Nanoro (CRUN) in Burkina Faso. *Malar J.* 2014; 13: 113.
- Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maïga HM, Sankaré O, Sow M, Di Deco MA et Coluzzi M. “The Distribution and Inversion Polymorphism of Chromosomally Recognized Taxa of the *Anopheles gambiae* Complex in Mali, West Africa.” *Parassitologia.* 1998; 40: 477 – 511.
- Tripet F, Touré YT, Guimogo D et Lanzaro GC. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* revealed by DNA analysis of transferred sperm. *J Med Entomol.* 2003; 68: 1 - 5.

- Tripet F, Wright J, Cornel A, Fofana A, Mcabee R, Meneses C, Reimer L, Slotman M, Thiemann T, Dolo G, Traoré S et Lanzaro G. 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. 2007; 76: 81 - 87.
- Tubergen TA, Breaud TP et McConnell E. A technique for drying eggs of *Anopheles stephensi* and its effect on their viability after storage at 4°C. Mosq News. 1978; 38: 583 – 585.
- Van Handel E. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc. 1985a; 1: 299 - 301.
- Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc. 1985b; 1: 302 - 304.
- Van Handel E. Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field collected *Aedes vexans*. J Am Mosq Control Assoc. 1988; 4: 549 - e550.
- Vargas RI, Whitehand L, Walsh WA, Spencer JP, Hsu C et Hsu CL. Aerial releases of sterile Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by helicopter: dispersal, recovery, and population suppression. J Econ Entomol. 1995; 88: 1279 – 1287.
- Voordouw MJ et Koella JC. Genetic variation of male reproductive success in a laboratory population of *Anopheles gambiae*. Malar J. 2007; 6: 99.
- Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA et Feldmann HU. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. J Econ Entomol. 2000; 93: 123 - 135.
- Vreysen MJ, Robinson AS et Hendrichs J. Area-wide control of insect pests: from research to field implementation. Springer. 2007.
- Warburg MS et Yuval B. Effects of diet and activity on lipid levels of adult Mediterranean fruit flies. Physiol Entomol. 1996; 21: 151 - 158.
- Weidhaas DE, Schmidt CH et Seabrook EL. Field studies on the release of sterile males for the control of *Anopheles quadrimaculatus*. Mosq News. 1962; 22: 283 – 291.

- Weldon CW, Prenter J et Taylor PW. Activity patterns of Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*) are affected by both mass-rearing and sterilization. *Physiol Entomol.* 2010; 35: 148 - 153.
- Yamada H, Vreysen MJ, Gilles JR, Munhenga G et Damiens DD. The effects of genetic manipulation, dieldrin treatment and irradiation on the mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* in field cages. *Malar J.* 2014; 13: 318.
- Yaro AS, Dao A, Adamou A, Crawford JE, Ribeiro JM, Gwadz R, Traoré SF et Lehmann T. The distribution of hatching time in *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2006; 5: 19.
- Yuval B. The other habit-sugar feeding by mosquitoes. *Bull Soc Vector Ecol.* 1992; 17: 150 - 156.
- Yuval B, Wekesa JW et Washino RK. Effect of body Size on Swarming Behavior and Mating success of Male *Anopheles freeborni* (Diptera: Culicidae). *J Insect Behav.* 1993; 6: 333 - 342.
- Yuval B, Holliday-Hanson M et Washino RK. Energy budget of swarming male mosquitoes. *Ecol Entomol.* 1994; 19: 74 - 78.
- Yuval B, Kaspi R, Shloush S et Warburg MS. Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecol Entomol.* 1998; 23: 211 - 215.
- Zaim M, Aitio A et Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol.* 2000; 14: 1 - 5.
- Ziegler R et Ibrahim MM. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 2001; 47: 623 – 627.

Documents consultés

- Annuaire Statistique. Burkina Faso Ministry of Health: 2011; http://www.sante.gov.bf/phocadownload/Annuaire_statistique_2011.pdf; (consulté le 12 Décembre 2014)
- OMS. Comité d'experts du paludisme, 6e édition. Genève : OMS-Série Rapport technique n°. 1957; 123; (consulté le 15 Janvier 2014).
- OMS. Statistiques sanitaires mondiales. 2010; (consulté le 15 Juillet 2010). www.who.int/entity/whosis/whostat/FR_WHS10_Full.pdf

OMS. World Malaria Report. Résumé et points essentiels. 2013; (consulté le 20 décembre 2014).

http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr13_resume_points_essentiels.pdf.

RBM. 2014; (consulté le 10 Mars 2015). <http://rollbackmalaria.org/>

WHO. World Malaria Report. 2013; Geneva; (consulté le 11 Juin 2014).

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour l'identification des spécimens du terrain

-Extraction d'ADN au chelex : une ou deux pattes de chaque spécimen ont été enlevées et introduites dans un tube d'Eppendorf de 1,5 ml. Elles ont été imbibées dans 100 µl de Chelex 5% et incubées au bain-marie pendant 60 minutes. Chaque tube est brièvement vortexé puis porté à 95°C pendant 30 minutes. Chaque tube est de nouveau brièvement vortexé puis centrifugé pendant quelques secondes pour éliminer toute trace de solution sur les parois du tube. L'ADN ainsi préparé et dilué dans l'eau de la solution de chelex alors que les billes de la résine captent les impuretés protéiques. L'ADN obtenu a été conservé à -20°C avant utilisation.

-Amplification : Pour chaque spécimen, 23 µl de milieu réactionnel mixte (enzyme, dNTP, cofacteur et amorces) ont été ajoutés à 2 µl d'extrait d'ADN dilué au 1/10. Les tubes ont été placés dans le thermo cycler mis en marche selon le programme d'amplification suivant: 10 minutes à 94°C pour dénaturer l'ADN, suivies de 35 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes pour l'hybridation des amorces à 54°C et 60 secondes d'élongation à 72°C.

-Migration et révélation : La migration de l'ADN est faite pendant 60 minutes à 120 Volts par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (1,5 g d'agarose dans 100 ml de TBE, Tri Borate EDTA) et la présence des bandes d'ADN est révélée par visualisation sur un appareil à rayons ultraviolets. Les bandes typiques d'*An. coluzzii*, d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* sont obtenues respectivement à 479 pb (présence du gène Sine 200*6.1), à 249 pb (absence du gène Sine 200*6.1) et à 223 bp (absence du gène Sine 200*6.1).

Amorces

Sine 200X 6.1 F: TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA
Sine 200X 6.1 R: CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC

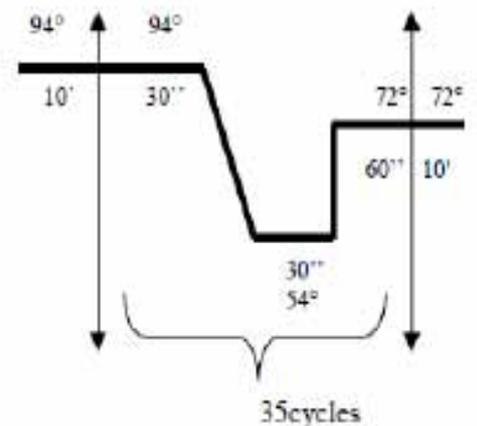
Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N201207) pour un volume final de 25µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	Pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10X Contenant 15 Mm MgCl2	1X 1.5mM	2.5 µl
5Mm dNTP	0.2mM	1 µl
Primer F (10µM)	1 pmoles	0.1 µl
Primer R (10µM)	1 pmoles	0.1 µl
Taq DNApolym (5U/µl)	2.5U	0.5 µl
DdH2O		20.3 µl
DNA template (1à5ng /µl)		0.5 µl

Amplification :

10'[30'' ,30'', 60'']35c @ 54°C



Taille attendue :

A. gambiae forme M :

A. gambiae forme S, *A. melas*, *A. quadrimaculatus* :

A. arabiensis :

479 bp (présence du gène Sine 200x 6.1)

249 bp (absence du gène Sine 200x 6.1)

223 bp (absence du gène Sine 200x 6.1)

Annexe 2 : Protocole de dosage des métabolites d'*An. gambiae s.l.* par spectrophotométrie
gamme des standards et Préparations des réactifs et solutions

Protocole de dosage des métabolites

<ul style="list-style-type: none"> * Enlever une patte et une aile * Placer le reste du moustique dans un tube (1,5ml) Eppendorf * Ajouter 100 µl de méthanol puis broyer * Ajouter à nouveau 100 µl de méthanol puis vortexer. * Séparer l'échantillon en deux fractions: 70µl pour les protéines et 70 µl pour les lipides, sucres et glycogène 			
PROTEINES	LIPIDES, SUCRES, GLYCOGENE		
Ajouter 730 µl H₂O physiologique	Ajouter 680 µl de chloroforme: méthanol		
Puis 200 µl Bradford	Puis 100 µl sulphate de sodium		
Lire après 15 min à 595 nm	Centrifuger (max)		
Séparer le surnageant en 2 fractions de 350 µl , une pour l'analyse des lipides et l'autre pour les sucres ; le culot pour l'analyse du glycogène			
	LIPIDES	SUCRES	GLYCOGENE
	Evaporer le surnageant à 95°C	Evaporer le surnageant à 95°C (éviter la dessiccation)	Renverser le tube sur du papier absorbant pour éliminer le reste de solvant
	Ajouter 37,5 µl d'acide sulfurique	Ajouter 1000 µl Anthone	Ajouter 1000 µl Anthone
	Chauffer pendant 5 min	Chauffer pendant 15 min	Chauffer pendant 15 min
	Refroidir puis ajouter 1000 µl Vanilline	Refroidir puis lire à 625 nm	Refroidir puis lire à 625 nm
	Lire après 10-15 min à 525 nm		

Gamme des standards utilisée

Gamme de standards Protéines									
Standard Albumine (25µg/ml H ₂ O physiologique)	0 (cont rôle)	50µl (1,25 µg)	100 µl (2, 5µg)	2 00µl (5µg)	300µl (7,5 µg)	40 0µl (10 µg)	500µ l (12,5 µg)	60 0µl (1 5µg)	700 µl (17,5 µg)
Méthanol	70µl								
H₂O physiologique,	730 µl	680 µl	63 0µl	5 30µl	430 µl	33 0µl	230 µl	13 0µl	30 µl
Réactif de Bradford	200µl								
	Lire après 15 min à 595 nm								
Gamme de standards Lipides									
Standard Lipide (1 µg/µl chloroforme)	0 (cont rôle)	50 µl (1, 25µg)	100 µl (2, 5µg)	2 00µl (5µg)	300 µl (7, 5 µg)	400 µl (10 µg)	500 µl (12 ,5µg)	600 µl (15 µg)	700 µl (17,5 µg)
	Evaporer à 95°C								
Acide sulfurique	37,5µl								
	Chauffer pendant 5mn								
Réactif de Vanilline	1000µl								
	Lire à 525nm après 10-15mn								
Gamme de standards Sucres et Glycogène									
Standard de glucose (1 µg/µl éthanol)	0	1 µl	2 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl	30 µl
	Evaporer à 95°C (éviter la dessiccation (sucres))								
Anthrone	1000 µl								
	Chauffer pendant 15mn								
	Refroidir puis lire à 625 nm								

Préparations des réactifs et solutions

Réactif d'Anthrone:

- Mettre 300ml d'eau dans un Erlenmeyer
- Verser soigneusement 760ml d'acide sulfurique concentrée
- Dissoudre 1500mg d'Anthrone puis garder au réfrigérateur

Réactif de Vanilline:

- Dissoudre 600 mg de vanilline dans 100 ml d'eau chaude.
- Ajouter 400 ml d'acide phosphorique 85% puis garder dans une bouteille ambrée.

Sulfate de sodium:

- Mettre 2 g de sulfate de sodium dans un bécher.
- Compléter avec 100 ml d'eau puis garder la solution au réfrigérateur.

Solution standard de glucose (1mg/ml) pour la courbe d'étalonnage:

Dissoudre 100mg de glucose dans 100ml d'éthanol 25% puis garder au réfrigérateur.

Solution standard de lipides (100mg/100ml) pour la courbe d'étalonnage:

Dissoudre 100 mg d'huile végétale commerciale dans 100 ml de chloroforme puis garder à la température de laboratoire.

Chloroforme: Méthanol (1:2):

Mélanger un (1) volume de chloroforme pour deux (2) volumes de méthanol, puis garder à la température de laboratoire.

Eau physiologique:

Dissoudre 2,9 g de NaCl dans 250 ml d'eau puis garder au réfrigérateur.

Annexe 3 : Articles