

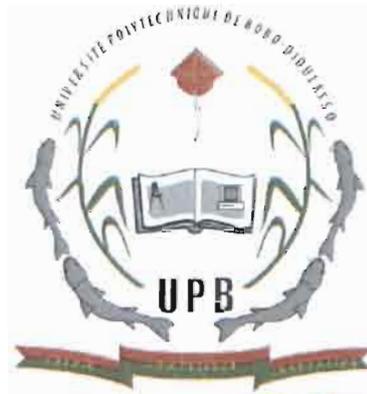
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR. DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

ECOLE DOCTORALE DES
SCIENCES DE LA SANTE (ED- SDS)

FORMATION DOCTORALE EN
PARASITOLOGIE MEDICALE



BURKINA FASO
Unité-Progrès -Justice



Année académique 2015-2016.

Mémoire N° 19

Évaluation du Chlorfénapyr, un insecticide pyrrole contre les populations naturelles d'*Anopheles gambiae s.l.* à la Vallée du Kou, au Burkina Faso.

MEMOIRE

Présenté et soutenu publiquement le 30 Juillet 2016

**Pour l'obtention du diplôme de Master en
Parasitologie-Entomologie-Mycologie médicales**

Par

Roger SANOU

Directeur du mémoire:

Dr. Abdoulaye DIABATE

Maître de Recherche, IRSS

JURY

Président: **Pr. Robert T. GUIGUEMDE**

Professeur titulaire de parasitologie, INSSA

Membres:

Dr. Sanata BAMBA

Maître de conférences agrégée, INSSA

DEDICACES

Je dédie ce travail

Au Seigneur tout puissant

à mes parents,

à mon fils Dieudonné Karol

à mon épouse W. Marie Valentine,

à toute la famille

à mes amis et collègues.

Trouvez en ce terme «merci» l'expression de toute ma profonde gratitude.

REMERCIEMENTS

Le Professeur Tinga Robert GUIGUEMDE, Professeur Titulaire de Parasitologie,

Pour avoir accepté que cette formation ait lieu. Merci Professeur du fond du cœur pour votre confiance et votre disponibilité à accompagner les jeunes sur les chemins de la recherche scientifique dans la rigueur et la discipline.

Vos qualités d'enseignant émérite nous ont beaucoup aidé au cours de cette formation et nous nous réjouissons d'avoir été formé et dirigé par vous. Puisse le Seigneur vous accorder une retraite dans la santé et la paix.

Le Professeur Nicolas MEDA, Directeur Général du Centre MURAZ

Pour avoir accepté notre inscription pour suivre cette formation. Merci DG pour votre engagement dans la formation scientifique de vos agents ce qui rehausse le niveau de formation et d'expertise de votre centre. Merci pour votre accompagnement.

Le Dr. Roch K. DABIRE, Directeur de recherche et Directeur de l'IRSS DRO de Bobo-Dioulasso

Je voudrais saluer l'esprit de combativité, de création, d'innovation dont vous avez fait preuve en tant que scientifique. Votre critique positive et votre perspicacité ont fait de vous un chercheur de renommée et vous ont valu votre nomination au poste de Directeur régional de l'Institut de recherche en sciences de la santé (IRSS). Vos conseils et votre constant rappel à la culture de l'excellence ont été pour nous un leitmotiv pour nous engager dans le domaine de la recherche particulièrement sur les vecteurs du paludisme.

Je voudrais par cette occasion vous dire merci du fond du cœur pour tout ce que vous faites pour la formation des jeunes scientifiques.

Le Dr. Abdoulaye DIABATE,

Pour m’ avoir proposé ce thème passionnant sur les insecticides. 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. Par votre constant rappel à la culture de l’ excellence dans le travail, vous avez été plus qu’ un modèle pour nous. Votre soutien a été inestimable dans la réalisation de ce travail. Je vous suis reconnaissant quant aux moyens matériels et scientifiques mis à ma disposition. Veuillez trouver en ce terme “merci” petit mot mais grand par le sens, l’ expression de toute ma profonde gratitude à votre égard et au staff que vous dirigez. Merci du fond du cœur pour la confiance que vous m’ avez toujours accordée et que le Seigneur vous accorde au-delà de vos attentes.

Le Dr P. Simon SAWADOGO.

Merci pour avoir pris le temps de corriger ce document afin qu’ il réponde aux normes de qualité scientifique. Merci beaucoup pour votre soutien et vos conseils. Dieu vous bénisse.

Le Dr Hamidou MAIGA.

Merci pour la patience, le temps et les conseils pratiques qui nous ont permis d’ améliorer la qualité rédactionnelle de ce document. Puisse le Seigneur vous rendre au centuple les efforts consentis.

Le Dr. Léa PARE/TOE, pour vos multiples conseils, preuve de l’ intérêt que vous portez à notre formation.

Les tantes Natogoma TRAORE, Odile NAPON et Mme Inès YAMEOGO, les tontons Issiaka TAMBOULA et Bakary TRAORE, toute ma profonde gratitude pour tout le soutien et les conseils multiformes que vous m’ avez prodigués. Merci pour tout et que Dieu vous bénisse.

Les Dr. Moussa NAMOUNTOUGOU, Robert K. OUEDRAOGO et Nina GOUBA, merci pour tout le soutien et les conseils. Que Dieu vous bénisse

Tout le Personnel du Centre MURAZ et de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS/Bobo), pour l'accueil et l'appui apporté. Merci pour votre collaboration et votre soutien

Mention spéciale à tous les Techniciens du Centre MURAZ/IRSS en général et de l'Entomologie en particulier, Abdoulaye OUATTARA, Souleymane SANOU, Sougrinoma ZOUNGRANA, Ali OUARI, Z. Hyacinthe GUEL, Sèni ILBOUDO, Abdourasmané KABRE, Ibrahim DIABATE, Noufou DIABATE et Fulbert ZOUNGRANA avec qui j'ai beaucoup appris à travers le travail abattu sur le terrain comme au laboratoire. Merci de tout cœur pour votre aimable soutien.

Tous mes camarades étudiants de l'IRSS/Centre MURAZ, Koama BAYILI, D. François de Salle HIEN, Séverin N'DO, Etienne BILGO, Abel MILLOGO, Dieudonné SOMA, Arthur DJIBOUGOU, Constant SIRIMA, Abdoul Azize MILLOGO, Nourou BARRY, Serges PODA, Sibiri YARGA pour la bonne ambiance en classe et au laboratoire. Merci à vous tous pour vos conseils et votre soutien. Un 'big up' à Koama BAYILI et Ali NANA pour avoir accepté de prendre un peu de leur temps pour lire ce document et y apporter leurs contributions. Merci pour votre aide. Que Dieu vous bénisse.

Mon épouse W. Marie Valentine, merci pour la compréhension et les sacrifices consentis. Puisse le Seigneur tout puissant raffermir davantage notre union et te donner d'abondantes grâces.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury pour avoir accepté sans hésitation d'évaluer et de juger ce travail. Je suis convaincu que vos suggestions, remarques et critiques contribueront à l'amélioration de ce manuscrit. Soyez assurés de mon très grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de BASF en collaboration avec l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (I.R.S.S.).

Que tous ceux qui de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail, trouvent ici mes sincères remerciements.

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
SOMMAIRE	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
SIGLES ET ABBREVIATIONS	X
RESUME	XI
INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	3
CHAPITRE I: GENERALITES.....	4
I.1. Vecteurs	4
I.1.1. Cycle biologique et comportement des vecteurs	4
I.2. Lutte anti-vectorielle	5
I.2.1. La lutte chimique	6
I.2.1.1. Moustiquaires imprégnées d'insecticides	6
I.2.1.2. La Pulvérisation Intra-Domiciliaire (PID) d'insecticides à effet rémanent	7
I.2.2. La lutte physique.....	7
I.2.3. La lutte mécanique contre les vecteurs	7
I.2.4. La lutte biologique contre les vecteurs.....	8
I.2.4. La lutte génétique ou modification du patrimoine génétique	9
I.3. Les Insecticides.....	9
I.3.1. Définition de l'insecticide	9
I.3.2. Les principaux insecticides.....	10
I.3.3. Le Chlorfénapyr (CFP).....	12

I.3.3.1. Définition	12
I.3.3.2. Mode d'action du CFP	13
I.4. Mécanismes de résistance.....	13
I.4.1. Définition de la résistance	13
I.4.2. Les principaux mécanismes de résistance	14
I.4.2.1. Résistance métabolique.....	14
I.4.2.2. Résistance par modification de la cible	14
I.4.3. Mécanismes secondaires de la résistance.....	15
 CHAPITRE II: NOTRE ETUDE	 16
 II.1. Matériel et Méthodes.....	 16
II.1.1. Site de l'étude	16
II.1.2. Première partie: Evaluation de l'efficacité en phase I (Laboratoire).....	18
II.1.2.1. Espèces utilisées.....	18
II.1.2.2. Insecticides utilisés.....	18
II.1.2.3. Test en bouteilles CDC (Center for Disease Control and prevention)	18
II.1.3. Deuxième partie: Evaluation de l'efficacité en phase II (cases expérimentales) ..	19
II.1.3.1. Description de la case expérimentale	19
II.1.3.2. Application de l'insecticide et évaluation	20
II.1.3.2.1. Pulvérisation et insecticides utilisés.....	20
II.1.3.2.2. Evaluation en case expérimentale.....	21
II.1.3.3. Collecte des moustiques et détermination des paramètres entomologiques ...	21
II.1.3.4. Bioessais	22
II.1.3.5. Analyses statistiques.....	23
 II.2. Considérations éthiques.....	 24
 II.3. RESULTATS	 25
II.3.1. Détermination de l'efficacité en phase I (au laboratoire)	25
II.3.2. Evaluation de l'efficacité en phase II	29
II.3.2.1. Détermination des paramètres entomologiques dans les cases expérimentales	29
II.3.2.2. Tests Biologiques ou tests de rémanence en cône dans les cases expérimentales	35
 II.4. DISCUSSION.....	 38
II.4.1. Efficacité du CFP en phase I	38
II.4.2. Efficacité du CFP en phase II en milieu naturel.....	39
II.4.2.1. Déterrence ou effet dissuasif.....	39
II.4.2.2. Exophilie.....	39

II.4.2.3. Prise de repas de sang et inhibition du repas de sang.....	40
II.4.2.4. Mortalité	41
II.4.2.5. Rémanence des insecticides utilisés	41
II.4.3. Place du CFP dans le management de la résistance	42
II.4.4. Limites de notre étude.....	42
CONCLUSION.....	43
PERSPECTIVES.....	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45
ANNEXES	i

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle biologique du moustique <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	5
Figure 2: Schéma du développement d'une résistance	14
Figure 3: Site d'étude	17
Figure 4: Vue de face d'une case expérimentale et sa véranda piège	20
Figure 5: Test en cône en case expérimentale à VK7	23
Figure 6a: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testée avec le CFP en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	26
Figure 6b: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> de VK7 testée avec le CFP en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	26
Figure 7a: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testée avec le CFP aux doses amendées en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	26
Figure 7b: Mortalité d' <i>An. gambiae s.l.</i> de VK7 testée avec le CFP aux doses amendées en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	26
Figure 8a: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testée avec Alpha-cyperméthrine en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	27
Figure 8b: Mortalité d' <i>An. gambiae s.l.</i> de VK7 testée avec Alpha-cyperméthrine en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	27
Figure 9: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testée avec Alpha-cyperméthrine en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	27
Figure 10a: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu testée avec le bendiocarb en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	28
Figure 10b: Mortalité d' <i>An. gambiae s.l.</i> de VK7 testée avec le bendiocarb en test en bouteille, 24 à 72 heures après observation	28
Figure 11: Mortalité d' <i>An. gambiae</i> de VK7 collectée pendant les 4 mois comparée au contrôle et en 24 à 72 heures d'observation	29
Figure 12a: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu en test en cône <i>in situ</i> en 24 heures après pulvérisation et en 24 à 72 heures d'observation	35
Figure 12b: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae s.l.</i> de VK7 en test en cône <i>in situ</i> en 24 heures après pulvérisation et en 24 à 72 heures d'observation	35
Figure 13a: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu en test en cône <i>in situ</i> un mois après pulvérisation en 24 à 72 heures d'observation	36

Figure 13b: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae s.l.</i> de VK7 en test en cône <i>in situ</i> un mois après pulvérisation en 24 à 72 heures d'observation.....	36
Figure 14a: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu en test en cône <i>in situ</i> 2 mois après pulvérisation en 24 à 72 heures après exposition.....	37
Figure 14b: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae</i> de VK7 en test en cône <i>in situ</i> 2 mois après pulvérisation en 24 à 72 heures après exposition.....	37
Figure 15a: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae</i> Kisumu en test en cône <i>in situ</i> 3 mois après pulvérisation en 24 à 72 heures après exposition.....	37
Figure 15b: Résumé de la mortalité d' <i>An. gambiae</i> de VK7 en test en cône <i>in situ</i> 3 mois après pulvérisation en 24 à 72 heures après exposition.....	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Répartition des moustiques <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans les cases expérimentales en Août 2013.....	30
Tableau 2: Répartition des moustiques <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans les cases expérimentales en Septembre 2013.....	31
Tableau 3: Répartition des moustiques <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans les cases expérimentales en Octobre 2013.....	32
Tableau 4: Répartition des moustiques <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans les cases expérimentales en Novembre 2013.....	33
Tableau 5: Récapitulatif des moustiques d' <i>An. gambiae s.l.</i> collectés dans les cases dans les cases expérimentales pendant l'étude.....	34

SIGLES ET ABBREVIATIONS

<i>ace.1</i> [®]	: Acétylcholinestérase-1, gène de résistance
<i>al.</i>	: <i>alii</i> (et les autres)
<i>An.</i>	: <i>Anopheles</i>
ed	: Edition
ANOVA	: Analyse de la variance
NaVdp	: Canal sodium Voltage dépendant
CFP.....	: Chlorfénapyr
DDT	: Dichloro diphenyl trichloroéthane
GABA	: Acide Gamma Aminobutyrique
PID	: Pulvérisation Intra domiciliaire
IRSS	: Institut de Recherche en Sciences de la Santé
MILDA	: Moustiquaire Imprégnée d'insecticide à Longue Durée d'Action
ORSTOM	: Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer
OMS	: Organisation Mondiale de la santé
VK	: Vallée du Kou
VK7	: Vallée du Kou secteur 7
UICPA	: Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
WHOPES	: World Health Organization for Pesticide Evaluation Scheme
WHO	: World Health organisation

RESUME

La lutte anti-vectorielle engagée contre les vecteurs potentiels du paludisme repose principalement sur la pulvérisation intra domiciliaire et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action. Ces stratégies ont longtemps été le socle de la lutte anti vectorielle mais de nos jours la résistance à certains insecticides utilisés freine ces efforts. Face à la résistance croissante surtout aux pyréthrinoïdes, les plus utilisés en santé publique, la nécessité de trouver de nouveaux outils capables de freiner cette résistance s'impose.

Notre étude a évalué non seulement l'efficacité du Chlorfénapyr, de l'Alpha-cyperméthrine et du Bendiocarb en utilisation seule en phase I, mais aussi en phase II, avec en plus deux combinaisons du Chlorfénapyr avec l'Alpha-cyperméthrine sur les populations d'*Anopheles gambiae s.l.* vecteurs majeurs du paludisme au Burkina Faso. Ces insecticides ont été testés en phase I sur les moustiques sensibles et sur les moustiques résistants, élevés à l'insectarium.

L'efficacité a été testée en termes de mortalité en phase I au laboratoire sur la souche sensible d'*An. gambiae* Kisumu et sur les populations d'*An. gambiae s.l.* résistantes aux pyréthrinoïdes, élevées à l'insectarium. En milieu naturel, la phase II a consisté à l'évaluation de l'efficacité en termes de mortalité, de déterrence, d'inhibition du repas de sang et d'exophilie sur les populations résistantes d'*An. gambiae s.l.*

Les mortalités observées avec les différents insecticides testés au laboratoire (phase I) ont varié de 87 à 100% avec les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* et en milieu naturel (phase II), elles ont varié de 1 à 42 % sur les mêmes moustiques. La protection individuelle en termes d'inhibition du repas de sang (0 à 15%) et d'effet dissuasif (déterrence 0 à 13%) est restée faible. L'exophilie en cases expérimentales quant à elle, est restée modérée de 30 à 46%.

Le chlorfénapyr utilisé seul 150mg et 250mg/m², a tué plus de moustiques (34 et 42%) en conditions expérimentales qu'en combinaison avec l'alpha-cyperméthrine, mais l'utilisation de cet insecticide avec un pyréthrinoïde plus répulsif pourrait être d'un grand apport dans le management de la résistance aux insecticides sans cesse croissante.

Mots clés: *Anopheles gambiae s.l.*, chlorfénapyr, pyréthrinoïde, résistance, pulvérisation, mortalité, déterrence, inhibition.

SUMMARY

The potential malaria vector control is currently and mainly based on the indoor residual spray (IRS) and the long lasting insecticide treated net (LLIN). These strategies have been so far the basis of the vector control but nowadays in front of the emergence and spread of insecticide resistance to pyrethroids widely used in public health, there is an urgent need to find new and more efficacious tools.

Our study was not only intended to evaluate the efficacy of Chlorfenapyr, Apha-cypermethrin and Bendiocarb used alone in phase I, but also in phase II with two combinations of Chlorfenapyr with Alpha-cypermethrin against the *Anopheles gambiae s.l* populations which are the major malaria vectors in Burkina Faso. These insecticides have been tested in phase I on susceptible mosquitoes and resistant mosquitoes reared in the insectary.

The efficacy has been assessed in terms of mortality in phase I in the lab on susceptible *An. gambiae* Kisumu and resistant populations *An. gambiae s.l.* to pyrethroids reared in the insectary. In the experimental huts in field, this efficacy was evaluated in terms of mortality, deterrency, blood feeding and blood feeding inhibition and the exophily of wild resistant *An. gambiae s.l* populations.

The mortality results with the different insecticides used in the lab (phase I) ranged from 87 to 100% on natural *An. gambiae s.l.* populations while in the field (phase II) this mortality varied from 1 to 42% on the same strains.

The personal protection in terms of blood feeding inhibition (0 to 15%) and the deterrency (0 to 13%) was low, however the exophily in experimental huts was moderated, ranged from 30 to 46%.

The CFP alone (150 mg and 250mg/m²) gave more effective mortality (34 and 42%) in experimental conditions than combined with alpha-cypermethrin. However this insecticide used with a more effective and repulsive pyrethroid has the potential to control malaria vectors populations and could be a great tool in the management of the resistance.

Key words: *Anopheles gambiae s.l.*, chlorfénapyr, pyrethroids, resistance, spraying, mortality, deterrency, inhibition.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire tropicale causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre d'anophèles femelles. Les vecteurs du paludisme appartiennent à la famille des *Culicidae* et au genre *Anopheles*. Seuls les anophèles femelles se nourrissent de sang. Cette maladie représente un des problèmes majeurs de santé publique dans le monde et particulièrement en Afrique Subsaharienne où elle est une des principales causes de morbidité et de mortalité. Avec 214 millions de cas de paludisme et 438 000 décès enregistrés en 2015, le paludisme reste la maladie parasitaire tropicale la plus importante en termes de décès dans le monde [1]. Environ 91% des décès mondiaux surviennent dans la seule région Afrique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et 70% de ces cas concernent les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes [2].

Au Burkina Faso, le taux de mortalité est passé actuellement de 1,8% en 2012 à 1,4% en 2013 [3] puis à 1,2% (soit 5 632 décès sur 463 774 cas et) en 2014 [4].

Le paludisme représente un des défis majeurs de notre époque contemporaine tant sur le plan du traitement (résistance aux médicaments) que dans la prévention (résistance aux insecticides); ce qui constitue un réel problème pour son éradication et son élimination malgré les progrès réalisés.

Dans sa politique de lutte contre le paludisme, l'OMS a adopté et basé ses stratégies sur l'amélioration du traitement des cas, le traitement préventif intermittent de la femme enceinte, la chimio prophylaxie saisonnière des enfants de moins de 5 ans et la prévention de la transmission par la lutte anti-vectorielle (LAV). Actuellement ces stratégies connaissent des limites dans leur application à cause de la résistance croissante constatée [5,6].

Au fil des années, les outils d'intervention utilisés dans la LAV (Moustiquaires imprégnées d'Insecticide à Longue durée d'Action (MILDA), la Pulvérisation Intra Domiciliaire (PID)) et les traitements médicamenteux se sont accrus et améliorés. Cependant, le parasite tout comme le vecteur ont développé des résistances respectivement liées aux molécules dans le traitement de la maladie [5] et aux insecticides utilisés dans la LAV.

L'usage intempestif des insecticides en agriculture serait à la base de cette flambée de résistance constatée chez les vecteurs [6,7].

La résistance aux insecticides a été signalée dans 49 des 63 pays de l’OMS ayant communiqué leurs données depuis 2010 [8] et qui fait état d’une résistance à au moins deux classes d’insecticides. La résistance aux pyréthrinoïdes, la classe d’insecticides la plus utilisée dans l’imprégnation des moustiquaires est la plus fréquente [8, 9].

Au Burkina Faso, dans la zone soudanienne, la résistance du vecteur majeur du paludisme, *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*), aux pyréthrinoïdes et au Dichloro Diphényl Trichloroéthane (DDT), associée à la mutation *Knock down resistance* Leucine-Phénylalanine (*Kdr* Leu-Phe) a été détectée depuis 2003 [10]. En 2008, une multi résistance chez *An. gambiae* a été observée dans les savanes humides de l’Ouest du Burkina Faso avec la présence concomitante de mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes, aux organophosphorés et aux carbamates [11]. Face à ces problèmes rencontrés dans la lutte contre le paludisme, la recherche scientifique s’est orientée vers l’identification de nouveaux outils pour combattre cette maladie.

C’est dans ce contexte de résistance croissante aux insecticides que notre étude intitulée «Evaluation de l’efficacité du Chlorfénapyr, un insecticide pyrrole, contre les populations naturelles d’*An. gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoïdes à la Vallée du Kou», a été menée.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'**Objectif général** était d'évaluer l'efficacité du Chlorfénapyr (CFP) en cases expérimentales sur les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.* résistantes aux pyréthriinoïdes.

Les objectifs secondaires étaient:

- ✓ de tester la susceptibilité basique du Chlorfénapyr, Alpha-cyperméthrine et du Bendiocarb sur les populations d'*An. gambiae s.l.* du milieu naturel
- ✓ d'évaluer l'efficacité et l'activité résiduelle du CFP seul et en combinaison avec l'Alpha-cyperméthrine en PID contre les populations naturelles d'*An. gambiae s.l.*
- ✓ de comparer l'efficacité du CFP en PID avec celle de l'Alpha-cyperméthrine et du bendiocarb selon les doses recommandées par l'OMS.

Et plus spécifiquement:

- ✓ de vérifier la déterrence (effet dissuasif) du Chlorfénapyr
- ✓ de décrire l'exophilie induite par le Chlorfénapyr
- ✓ de vérifier l'inhibition de repas de sang induite par le Chlorfénapyr
- ✓ et d'analyser la mortalité due au Chlorfénapyr en 72h après contact

CHAPITRE I: GENERALITES

CHAPITRE I: GENERALITES

I.1. Vecteurs

Les vecteurs du paludisme sont des anophèles appartenant au règne *Animalia*, au *Phylum* des *Arthropoda*, à la classe des *Insecta*, à l'ordre des *Diptera*, à la famille des *Culicidae* et au genre *Anopheles*. La connaissance du comportement de ces vecteurs, de leurs gîtes larvaires et de leur lieu de repos est fondamentale pour assurer l'efficacité de la lutte anti-vectorielle. La quasi-totalité des vecteurs majeurs de plasmodiums humains appartient à des complexes d'espèces jumelles, semblables sur le plan de leur morphologie externe. Ces vecteurs présentent des particularités biologiques, écologiques et génétiques très différentes.

Ainsi, parmi les 484 espèces d'anophèles répertoriées par Harbach (2004) [12], 72 font partie des 17 complexes d'espèces. La plupart de ces complexes regroupent à la fois des espèces vectrices et des espèces non vectrices. Il est donc primordial d'identifier correctement les espèces présentes dans une zone donnée, d'évaluer leur importance épidémiologique dans la transmission du plasmodium et de cibler correctement les actions de lutte à mener.

Parmi les 70 espèces, 41 sont considérées comme les vecteurs ayant un impact majeur en santé publique [13]. Parmi ces vecteurs décrits dans le monde, seulement une vingtaine (20) d'entre eux joue un rôle vecteur dans la transmission du paludisme. Au Burkina Faso les vecteurs majeurs en cause dans la transmission des plasmodiums sont: *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus* [14, 15].

I.1.1. Cycle biologique et comportement des vecteurs

La vie du moustique est composée de 4 stades distincts à savoir l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte ou imago.

- ✓ Les œufs munis de flotteurs latéraux sont pondus dans des gîtes à la surface des eaux stagnantes. La femelle d'*An. gambiae s.l.* pond en moyenne 60 œufs en conditions normales. Deux à trois jours après la ponte, les œufs éclosent et donnent des larves.
- ✓ Les stades larvaire et nymphal sont aquatiques et le stade adulte est aérien (Figure 1).

Le stade larvaire est composé de 4 étapes différentes (nommées stade 1, 2, 3 et 4), séparées par 4 mues. La durée du stade larvaire est température/ressources alimentaires/environnement dépendante.

Le stade nymphal, après une mue de la larve de stade 4, se caractérise par le fait que l'organisme ne se nourrit pas et l'éclosion de la nymphe conduit à l'imago (adulte).

La biologie de l'adulte est particulière dans le sens où, la femelle, pour amener ses œufs à maturité, a besoin obligatoirement de sang. En effet, ce repas de sang apporte la chaleur et les protéines nécessaires au développement des œufs.

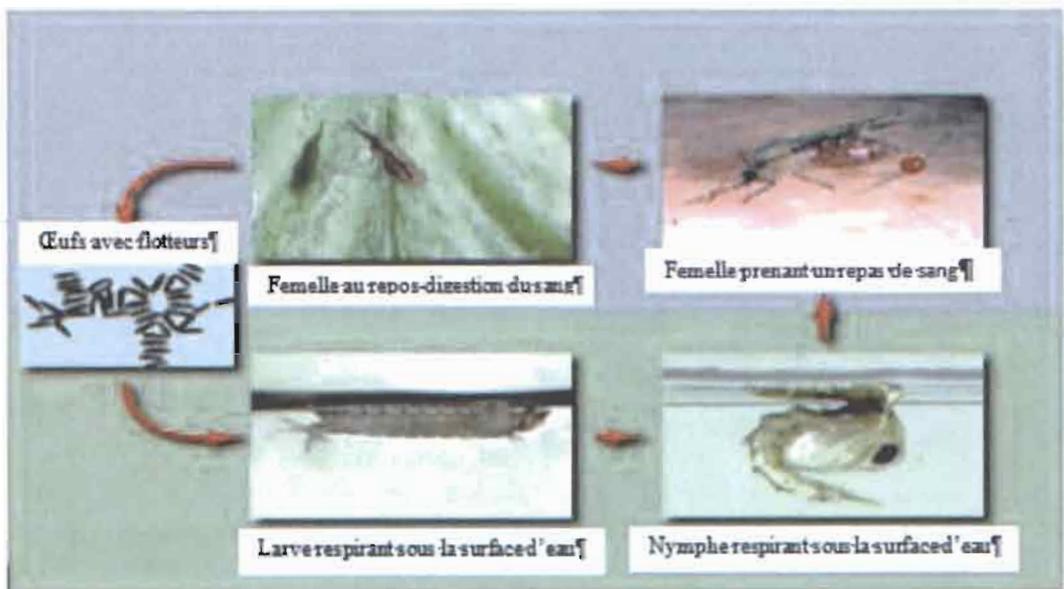


Figure 1: Cycle biologique du moustique *Anopheles gambiae s.l.*

Source : J. Brunhes et Coll., Les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM Ed., 1998 [16]

I.2. Lutte anti-vectorielle

La LAV vise à:

- ✓ supprimer ou limiter le contact vecteur-homme pour prévenir l'infection palustre,
- ✓ raccourcir la longévité des vecteurs, paramètre clé dans la transmission du paludisme,
- ✓ détruire les gîtes et les potentiels abris de larves.

La LAV a été recommandée par l'OMS comme outil de lutte contre le paludisme en appui au traitement médicamenteux et à l'éducation sanitaire [17]. L'utilisation d'insecticides pour l'imprégnation des moustiquaires et en PID est un des socles de la LAV [9,18].

A l'heure actuelle ces efforts de contrôle anti vecteurs connaissent des limites dans leur application à cause de la résistance aux insecticides, constatée presque partout dans le monde [8]. Les méthodes de LAV sont d'ordre chimique, biologique, physique et génétique.

I.2.1. La lutte chimique

C'est l'utilisation d'insecticides pour lutter contre les vecteurs du paludisme et les insectes nuisibles. Les différentes classes d'insecticides les plus utilisées en santé publique sont: les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les régulateurs de croissance (par exemple: le. Pyriproxyfen), et les toxines bactériennes (*Bacillus thuringiensis H-14* et *Bacillus sphaericus*) [19]. Les principaux outils de la LAV utilisant ces insecticides sont les MILDA et les PID dont l'application modifie souvent le comportement des moustiques.

I.2.1.1. Moustiquaires imprégnées d'insecticides

Les moustiquaires en bon état offrent une bonne protection mécanique pour limiter le contact vecteur-homme [20]. Imprégnées d'insecticides, elles produisent plusieurs effets simultanés [21]:

- un effet «dissuasif» empêchant l'entrée des anophèles dans les maisons
- un effet «excito-répulsif» repoussant les moustiques à l'extérieur des maisons peu après leur entrée [22]
- un effet *knockdown* (*kd* ou foudroiement des moustiques) ou létal (mort peu après leur contact avec le support traité) [23].

Cette stratégie de lutte constitue un des importants moyens de l'OMS contre le paludisme avec la distribution massive de MILDA dans le monde et particulièrement en Afrique [2].

Dans le monde, la protection durant les 10 dernières années, par un contrôle anti vectoriel, a substantiellement augmenté [2].

En Afrique sub-Saharienne en 2015, plus de la moitié de la population à risque soit 55%, dormait sous une MILDA [2]. L'impact de ces moustiquaires est en train d'être freiné par la résistance croissante des moustiques aux pyréthrinoïdes utilisés dans leur imprégnation. Cela a engendré une baisse de l'efficacité de ces moustiquaires imprégnées d'insecticides en zone de forte résistance [24,25].

1.2.1.2. La Pulvérisation Intra-Domestique (PID) d'insecticides à effet rémanent

La PID à l'aide d'insecticides à effet rémanent est un outil de la LAV destiné à réduire ou interrompre la transmission du paludisme. Les paramètres entomologiques évalués sont l'endophilie, l'anthrophilie, la densité culicidienne, le taux de piqûre, la rémanence et la sensibilité aux insecticides [20].

L'effet principal recherché est de diminuer la densité vectorielle en tuant les moustiques quand ils pénètrent dans les maisons et se posent sur les surfaces traitées (moustiques anthropophages, endophages et/ou endophiles). Les aspersions intra domestiques sont peu efficaces contre les espèces exophages et exophiles. Cependant plus l'espèce est anthropophile, endophage et endophile, plus les aspersions intra domestiques sont efficaces [26]. En 2011, 80 pays dont 38 dans la Région Afrique, recommandaient les PID dans la lutte contre le paludisme [8].

1.2.2. La lutte physique:

La lutte physique ou « environnementale » regroupe toutes les actions menées sur l'environnement pour rendre ce dernier hostile au développement des populations de vecteurs [23]. La lutte physique en milieu naturel consiste notamment à éliminer les gîtes larvaires de l'espèce cible par drainage, par:

- ✓ modification des conditions physico-chimiques de l'eau (en augmentant la salinité de l'eau, ou en épurant l'eau),
- ✓ modification de la topographie (talutage et désherbage des berges),
- ✓ suppression des zones d'ombre et des gîtes anthropiques (pots de fleurs, pneus abandonnés),
- ✓ colmatage des cavités des (ou dans les) arbres, etc.

Ces méthodes sont applicables partout où l'espèce-cible est inféodée plus ou moins spécifiquement à certains types de gîtes larvaires et que ceux-ci peuvent être effectivement supprimés.

1.2.3. La lutte mécanique contre les vecteurs

La lutte mécanique rassemble les méthodes de capture des vecteurs visant à réduire l'abondance des populations de vecteurs dans un espace donné et celles qui empêchent ou permettent d'éviter le contact vecteur/hôte.

Différentes techniques comme les pièges attractifs (utilisant le dioxyde de carbone), d'autres attractants olfactifs et/ou de la lumière sont utilisés pour capturer et éliminer les moustiques. Une méthode mécanique par excellence, s'opposant au contact vecteur/hôte, est l'utilisation systématique de moustiquaires inertes ou imprégnées d'insecticide; où l'effet mécanique de la moustiquaire est doublé d'une méthode de lutte chimique. Il s'agit d'un moyen clé de lutte contre la plupart des espèces endophages, en particulier les anophèles vecteurs du paludisme.

I.2.4. La lutte biologique contre les vecteurs

La lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants ou de produits qui en dérivent pour détruire les vecteurs et les ravageurs. Elle s'appuie sur la relation proie-prédateur (Exemple: poissons larvivores) ou hôte-parasite/hôte-pathogène (Exemple: virus, bactéries, champignons, etc).

L'intérêt de cette lutte est d'empêcher l'augmentation des phénomènes de résistance aux insecticides de synthèse (Exemple: Organophosphorés, pyréthrinoïdes, etc) et à certains bio-insecticides (Exemple: *Bacillus sphaericus*). La paupérisation des substances actives disponibles et des familles chimiques, leur impact potentiel ou avéré sur les écosystèmes et la biodiversité, ou encore l'impossibilité d'agir avec les méthodes classiques sur certaines espèces en raison de leur éthologie rendent cette méthode encore nécessaire. Ce sont principalement:

- Les insectes (des moustiques comme les Toxorhynchites), les hémiptères,
- Les Copépodes (*Cyclops sl*)
- Les poissons larvivores (*Gambusia affinis*)
- Les champignons (*Lagenidium giganteum*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*).

Les plus promoteurs sur le terrain sont les deux bactéries sporulantes appartenant au genre *Bacillus* [27]: *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ou (Bti.) et *Bacillus sphaericus*. Ces bactéries forment des spores et des toxines entomopathogènes puissantes et stables.

Cette lutte biologique existe mais elle n'est pas encore utilisée à grande échelle. La nature se régulant soi-même, les hommes sont ainsi souvent protégés contre certains agents nocifs. L'ampleur de cette stratégie de lutte n'est pas encore visible dans la lutte contre le paludisme sur le plan mondial.

I.2.4. La lutte génétique ou modification du patrimoine génétique

La lutte génétique consiste à réduire le potentiel reproducteur des vecteurs par une altération ou un remplacement du matériel héréditaire [28]. Il existe deux objectifs de la stratégie d'utilisation de ces vecteurs génétiquement modifiés:

- Les lâchers massifs de mâles génétiquement modifiés qui ont pour but de supplanter la population locale de moustiques. Ainsi, l'acceptabilité de cette stratégie par la population humaine est délicate.
- L'autre stratégie vise à réduire ou éradiquer la population de moustiques pour limiter le taux de transmission. Elle permet de réduire le nombre de femelles adultes et donc la sensation de nuisance. Cette stratégie repose sur l'utilisation de mâles stériles ou de mâles génétiquement modifiés stériles [29,30, 31]. La technique de l'insecte stérile (TIS) classique consiste à irradier (au moyen de rayons gamma ou X) des moustiques mâles provoquant des mutations les rendant infertiles [32,33]. Les mâles stériles sont ensuite lâchés en masse dans la zone ciblée et vont s'accoupler avec les femelles locales qui, ainsi fécondées, ne pourront pas obtenir de descendance.

Cette technique apparaît très élégante, parfaitement spécifique, non polluante et sans danger mais est extrêmement onéreuse et d'application limitée.

Le lâcher d'insectes infectés par des bactéries du genre *Wolbachia*, utilisant les incompatibilités cytoplasmiques conduisant à la stérilité, est également en développement [28, 34, 35].

Plusieurs mécanismes éventuels ont été proposés pour le contrôle génétique des insectes vecteurs, mais sont jusqu'à présent, au stade d'expérimentation pour mieux appréhender les contours d'une application effective et efficiente sur le terrain.

I.3. Les Insecticides

I.3.1. Définition de l'insecticide

Un insecticide est une substance active ou une préparation susceptible de tuer les insectes (ou d'autres Arthropodes), leurs larves et (ou) leurs œufs. Ils appartiennent au groupe des pesticides, eux-mêmes inclus dans les biocides. La totalité des insecticides est issue de la lutte contre les insectes nuisibles en agriculture [26].

I.3.2. Les principaux insecticides

Les principaux insecticides de synthèse sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les benzolurées. Les autres insecticides sont d'origine végétale, bactérienne et nous avons aussi une nouvelle classe appelée les pyrroles (chlorfénapyr).

a) Les Organochlorés

Ces insecticides sont issus de l'industrie du chlore. Très utilisés de 1940 à 1970, leur emploi est en très nette régression. Ils agissent par contact sur le système nerveux central.

Les organochlorés sont des toxines neurotropes qui altèrent le fonctionnement des canaux sodium indispensables à la transmission de l'influx nerveux et les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Leur spectre d'action est large.

La toxicité aiguë des organochlorés envers l'homme est relativement faible, dans les conditions normales d'utilisation. Ces substances sont très stables et bio-accumulables, peu solubles dans l'eau, d'où des problèmes d'accumulation dans les organismes (tissus végétaux et les graisses) et les écosystèmes (sols) via les chaînes alimentaires. A cause de leur persistance, ils ont été interdits par la convention de Stockholm du 22 Mai 2001 [36]. Outre leur rémanence excessive, leur utilisation a été freinée par des phénomènes de résistance apparus en particulier chez les Diptères dont certains moustiques. Ce sont par exemple: DDT, lindane, dieldrine, endosulfan, etc.

b) Les Organophosphorés

Les organophosphorés, dérivés de l'acide phosphorique sont nombreux et hétérogènes. Leur point commun est une certaine liposolubilité et un mode d'action sur le système nerveux par inhibition de la cholinestérase, qui est bloquée sous une forme inactive. L'acétylcholine s'accumule au niveau de la synapse, empêchant la transmission de l'influx nerveux et entraînant la mort de l'insecte. Ce mode d'action explique leur notable toxicité vis-à-vis de l'homme et des vertébrés à sang chaud. À la différence des organochlorés, les organophosphorés présentent une toxicité aiguë élevée mais une faible rémanence. Ils pénètrent facilement dans l'organisme des insectes par leur liposolubilité élevée. Ce sont par exemple : dichlorvos, malathion, fénitrothion, parathion, chlorpyrifos, diazinon, etc.

c) Les Carbamates

Ce vaste ensemble d'insecticides regroupe les dérivés de l'acide carbamique qui agissent, comme les organophosphorés, en inhibant la cholinestérase. Ils agissent le plus souvent par contact. Sauf exception, leur rémanence est généralement faible. Ce sont par exemple : Carbaryl, propoxur, bendiocarb, carbofuran, etc.

d) Les Pyréthrinoïdes

Insecticides de synthèse dits « de troisième génération », ils sont à base de pyrèthres naturels (extraits de plantes), en cherchant à augmenter leur toxicité et leur photostabilité envers les insectes. Dotés d'une toxicité considérable et agissant par contact, ils tuent presque instantanément les insectes par effet de choc neurotoxique (effet *Knock down* ou *Kd*), d'où leur utilisation à des doses très réduites. Ils agissent sur le système nerveux central et périphérique en modifiant les caractéristiques électro-physiologiques des protéines des canaux sodium voltage-dépendant (CnaVdp). Ces canaux une fois activés (c'est-à-dire en position ouverte), entraînent un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire générant un potentiel d'action [37]. Réputés peu toxiques pour les mammifères, très biodégradables et donc peu persistants, ils sont cependant très toxiques pour certains organismes aquatiques (poissons) ainsi que pour les auxiliaires de l'agriculture dont les abeilles. Nous avons comme exemples : bifenthrine, bioresméthrine, deltaméthrine, cyperméthrine, cyfluthrine, perméthrine, etc.

e) Les Benzyolurées

Ces insecticides larvicides se caractérisent par un mode d'action qui perturbe la formation de la chitine (perturbateurs de mues). La chitine synthétase est la cible de ces perturbateurs. Ils sont faiblement toxiques pour l'homme. Le délai d'action est de 2 à 7 jours. Leur demi-vie est de 2 semaines. Ce sont par exemples : diflubenzuron, triflunuron, etc.

f) Les insecticides d'origine végétale

Ces insecticides sont extraits de diverses plantes par macération, infusion ou décoction. Nous avons comme exemples: le pyrèthre et les dérivés du pyrèthre, les roténones, le géraniol, les alcaloïdes tels que (la nicotine et la morphine) etc.

Et comme exemples de plantes médicinales, nous avons *Quinquinas* (Quinine), *Artemisia annua* (Artésiminine), *Senna occidentalis* et *Senna alata* utilisées dans la lutte contre le paludisme

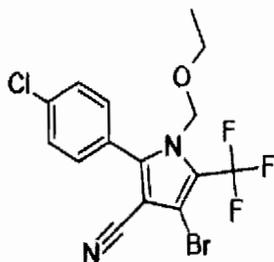
g) Les insecticides d'origine bactérienne

Certains bacilles à Gram positif, aérobies et sporulés, comme *Bacillus thuringiensis* ou *B. sphaericus* se retrouvent dans pratiquement tous les sols, l'eau, l'air et le feuillage des végétaux. Ils se distinguent des autres bacilles par une capacité à synthétiser et excréter des cristaux protéiques mortellement toxiques par ingestion pour certains insectes (Lépidoptère, Coléoptères et (ou) Diptères). La découverte du sérotype *israelensis* (Bti), très actif contre les larves de certains moustiques, a ouvert de nouveaux marchés mais leur rémanence est faible.

I.3.3. Le Chlorfénapyr (CFP)

I.3.3.1. Définition

Le chlorfénapyr est de formule chimique selon l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA): 4-bromo-2-(4-chlorophényl)-1-éthoxyméthyl-5-trifluorométhyl -1H-pyrrole-3-carbonitrile.



Formule chimique du CFP

Le chlorfénapyr appartient à la classe des insecticides appelés pyrroles [38]. Il est la matière active des produits à usage commercial *Pylon* (insecticide acaricide) et *Mythic*. L'insecticide *Mythic* est destiné à la lutte contre divers organismes nuisibles. Son application est limitée à l'extérieur des bâtiments, et dans la lutte contre les termites dans des lieux de pré-construction et de post-construction. Le chlorfénapyr est toxique pour les insectes pollinisateurs tels que les abeilles domestiques et les arthropodes. Il est persistant et non mobile dans le sol, mais aussi dans les sédiments aquatiques. Le chlorfénapyr ne montre pas de résistance croisée avec les insecticides conventionnels tels que les pyréthrinoïdes, les carbamates et les organophosphorés [39].

C'est un insecticide à faible toxicité sur les mammifères et pour cela il a été classé dans le groupe II comme un insecticide légèrement dangereux selon les critères de l'OMS [40]. Le chlorfénapyr est principalement commercialisé sous les formes de concentré émulsifiable (EC) et en suspension concentrée (SC) [41].

I.3.3.2. Mode d'action du CFP

Le chlorfénapyr est un insecticide qui agit par contact et par ingestion [41] en empêchant la synthèse de l'Adénosine Tri Phosphate (ATP) au niveau de la mitochondrie [42]. Il agit donc par découplage de la phosphorylation oxydative, empêchant la transformation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP). Ainsi, peu après avoir été exposé, l'organisme nuisible ciblé cesse de s'alimenter et meurt, faute de pouvoir produire sa propre énergie [21].

I.4. Mécanismes de résistance

I.4.1. Définition de la résistance

La résistance a été définie comme « l'apparition dans une souche d'insectes de la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce » par le Comité d'experts des insecticides de l'OMS [28].

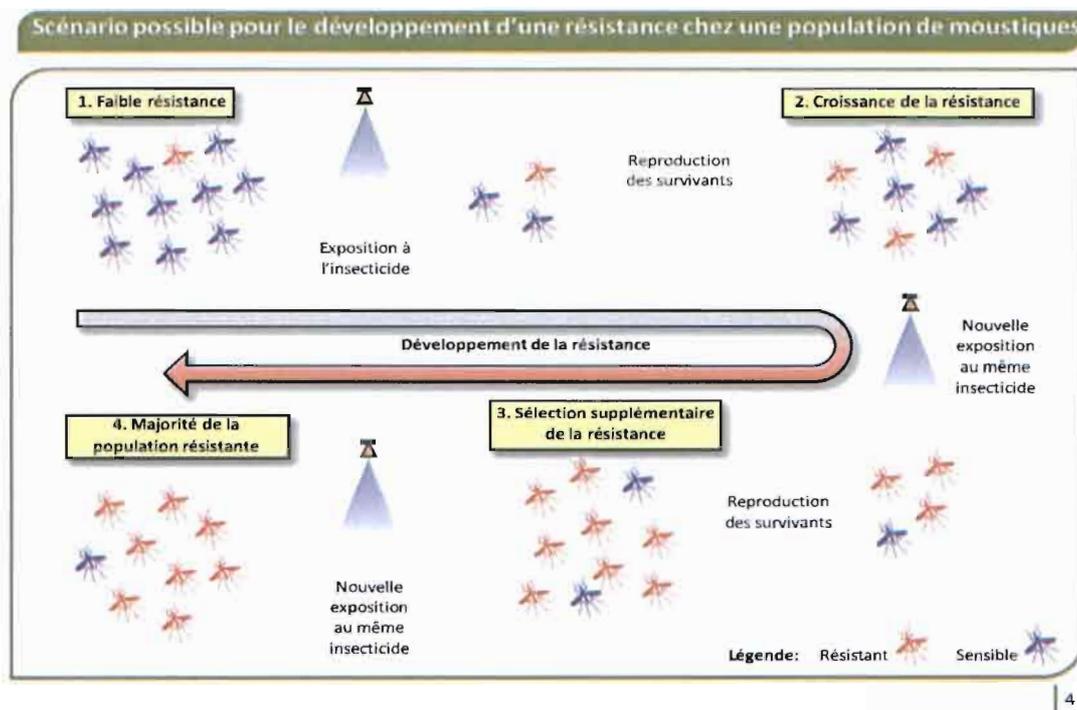


Figure 2: Schéma du développement d'une résistance

Source: Insecticide Resistance Action Committee: www.iraac-online.org 01/03/2015 à 10:15 [43].

I.4.2. Les principaux mécanismes de résistance

Les principaux mécanismes de résistance peuvent être classés en trois (3) catégories : la résistance métabolique, la résistance par modification de la cible et les mécanismes secondaires de la résistance.

I.4.2.1. Résistance métabolique

Ce mécanisme repose sur les systèmes enzymatiques que les moustiques utilisent pour assurer la détoxification des corps étrangers. C'est un mécanisme très efficace qui serait à l'origine de l'augmentation de l'activité catalytique et/ou de la quantité d'enzymes produites. Ces enzymes dégradent les insecticides en molécules non toxiques ou moins toxiques. Parmi les enzymes qui interviennent, nous avons les estérases, les monooxygénases à cytochrome P450 et les glutathion-S-Transférases.

I.4.2.2. Résistance par modification de la cible

Cette résistance est une mutation au niveau de la cible de l'insecticide conférant souvent des phénomènes de résistance croisée à tous les insecticides agissant sur la même cible.

Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux tels l'acétylcholinestérase (AChE), le canal Sodium voltage dépendant (CNaVdp) et le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Toute modification structurale diminuant leur affinité vis-à-vis des insecticides peut induire une résistance.

Trois exemples majeurs de résistance sont connus: les mutations au niveau des récepteurs de l'Acétylcholinestérase (*Ace.1^R*), des récepteurs de la Dieldrine (*Rdl*) et la mutation *Knock down* ou *Kdr*. L'exposition d'une souche sensible d'insectes à un pyréthrianoïde entraîne une paralysie très rapide (effet *Knock Down*). Cependant une mutation ponctuelle résultant du remplacement de la Leucine par la Phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le CNaVdp confère la résistance (mutation *kdr* Leu-Phe) aux pyréthrianoïdes et au DDT en Afrique [44].

Des études ont montré, en utilisant la séquence du génome d'*An. gambiae*, l'existence de deux gènes *ace.1* et *ace.2* codant pour deux AChE distinctes dont les fonctions diffèrent selon les espèces. Ainsi après clonage, il s'est avéré que la mutation *ace.1* est la cible des insecticides organophosphorés et carbamates chez *An. gambiae s.l.* [45].

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

I.4.3. Mécanismes secondaires de la résistance

Ils reposent sur une modification du comportement de l'insecte permettant d'éviter le contact avec la molécule d'insecticide. Ils se matérialisent par un changement du mode de vie de l'insecte qui devient soit exophage ou endophage et exophile ou endophile, anthropophile ou zoophile.

CHAPITRE II: NOTRE ETUDE

CHAPITRE II: NOTRE ETUDE

II.1. Matériel et Méthodes

II.1.1. Site de l'étude

La phase I de l'étude a été menée au laboratoire d'entomologie de l'IRSS et la phase II à la station expérimentale de la Vallée du Kou au secteur 7 (VK7) de Juin à Décembre 2013.

La Vallée du Kou est située à une trentaine de kilomètres au Nord-Ouest de Bobo-Dioulasso (Sud-Ouest du Burkina Faso) avec 4°24'42' de longitude Ouest et 11°23'14' de latitude Nord. Le site dispose d'une aire rizicole irriguée de 1 200 ha aménagées depuis 1970 et regroupe sept villages.

La pluviométrie moyenne annuelle est de 1 100 mm et le riz est la principale culture céréalière. Quelques insecticides sont utilisés sur cette culture mais sont intensivement utilisés aux alentours dans la culture du coton. Les moustiques sont permanents pendant toute l'année, avec un pic en Août-Septembre.

En raison de l'irrigation, les rizières offrent aux moustiques des gîtes de développement larvaire hautement productifs et permanents. La distribution des espèces *An. coluzzii* et *An. gambiae* est sujette à une dynamique spatio-temporelle avec une prédominance d'*An. coluzzii* toute l'année. L'espèce *An. gambiae* est observée vers la fin de la saison avec un pic de 30% [11].

La transmission du paludisme à Bama (Vallée du Kou) est assurée par *An. gambiae s.l.* et accessoirement par *An. funestus* [11]. Dans cette zone, la forte résistance des deux formes *An. coluzzii* et *An. gambiae* aux pyréthrinoides et au DDT a été observée et s'est généralisée à toutes les classes d'insecticides avec une fréquence très élevée de la mutation *kdr* (*knock down resistance*) L1014F (0,8-0,95) [10,15]. En plus de la mutation *kdr*, la fréquence d'*ace-1* est aussi observée. La résistance métabolique des moustiques aux insecticides n'a pas encore été formellement établie mais la forte élévation des enzymes telles que les estérases et les oxydases serait partiellement responsable de cette résistance observée dans la zone.

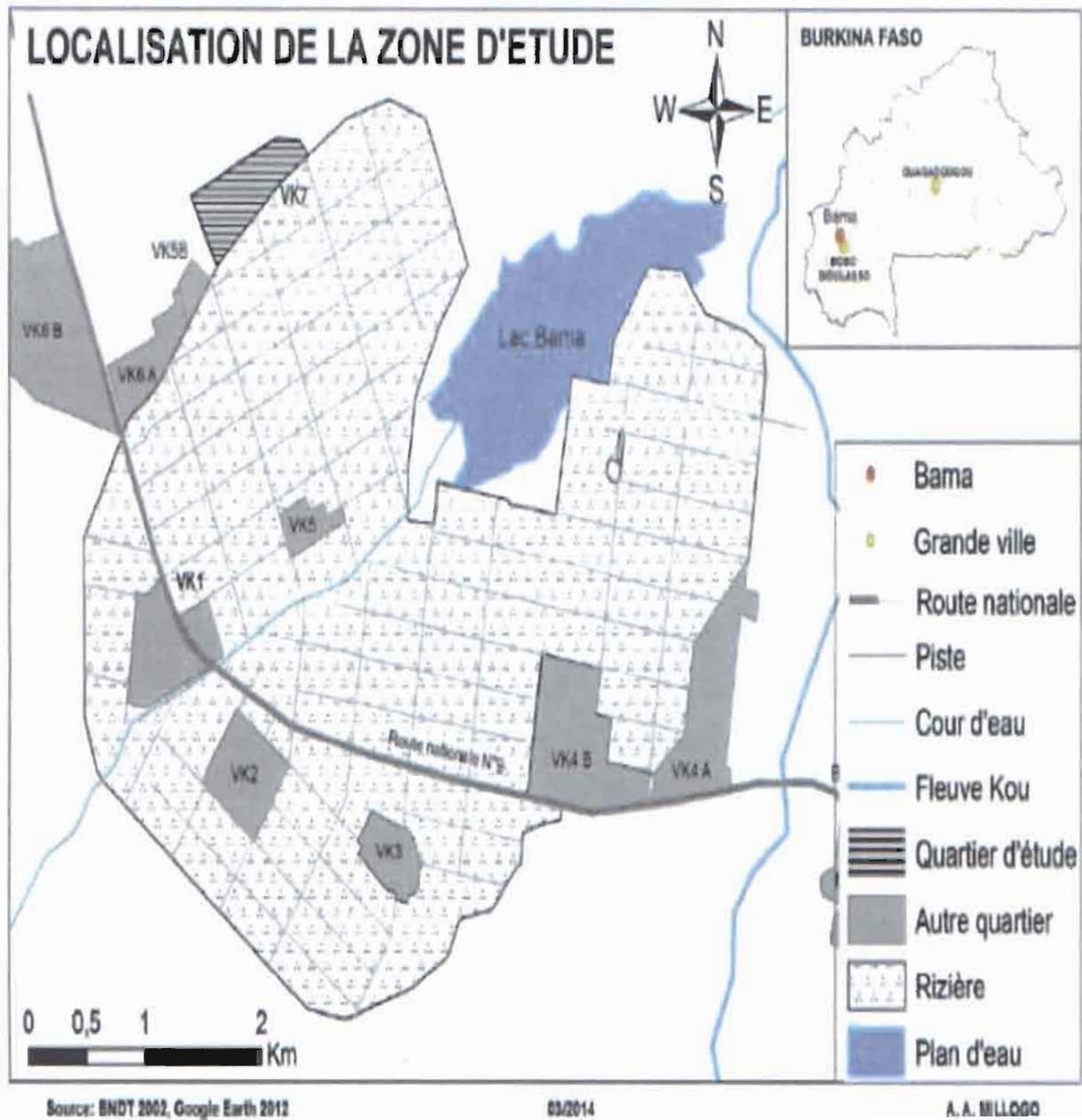


Figure 3: Site d'étude



II.1.2. Première partie: Evaluation de l'efficacité en phase I (Laboratoire)

II.1.2.1. Espèces utilisées

Pour les tests au laboratoire, deux espèces de moustiques ont été utilisées :

- La souche sensible, *Anopheles gambiae* Kisumu élevée à l'insectarium à la température de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une humidité relative de $80\pm 10\%$. Seules les femelles n'ayant pas été gorgées de sang et âgées de 3 à 5 jours ont été utilisées au cours de notre étude.
- La souche collectée sur le site d'étude: *Anopheles gambiae* s.l. issue d'une zone de résistance aux pyréthrinoïdes. Ces moustiques ont été collectés au stade larvaire sur le site d'étude (VK7) puis élevés à l'insectarium jusqu'au stade adulte. Tout comme la souche sensible *An. gambiae* Kisumu, seules les femelles adultes âgées de 3 à 5 jours et non gorgées ont été utilisées dans notre étude.

II.1.2.2. Insecticides utilisés

Les différents insecticides suivants ont été utilisés à savoir:

- le **Chlorfénapyr**: utilisé à des doses de (0,125%; 0,25%; 0,5%, 1%; 2% et 4%) et des doses amendées (diminution ou augmentation des doses initiales testées après accord du principal investigateur et du bailleur de fond) (0,0039%; 0,0078125%; 0,015625%; 0,03125% et 0,0625%)
- l'**Alpha-cyperméthrine**: à des doses de (0,00625%; 0,0125%; 0,025%; 0,05%; 0,1% et 0,2%) et comme doses amendées (0,000098% 0,00019125 ; 0,00039%; 0,00078125%; 0,0015625% et 0.003125%
- et le **Bendiocarb**: utilisé à la dose de 0,1% pour les tests en bouteille.

II.1.2.3. Test en bouteilles CDC (Center for Disease Control and prevention)

Ce sont des bouteilles d'une capacité de 250 ml avec couvercle qui ont été imprégnées avec les différents insecticides cités ci-haut. Les tests en bouteilles ont été développés pour offrir un autre espace aux moustiques au même titre que les tubes OMS. Ainsi, en face d'un insecticide certains paramètres biologiques tels que le *Knock down (Kd)*, la mortalité immédiate et retardée après 24, 48 et 72 heures après exposition pourront être mieux appréciés. Pour imprégner les bouteilles, l'insecticide en poudre a été pesé puis dissout dans de l'acétone avant de procéder à des dilutions successives.

Procédé du test:

L'insecticide a été dilué selon la dose indiquée par lot de 4 bouteilles. Ensuite nous avons procédé à l'imprégnation en roulant les bouteilles sur une surface plane en mouvements de va-et-vient pendant 45 minutes. Les bouteilles ont été gardées ouvertes après imprégnation pendant une nuit avant le test afin qu'elles puissent sécher. Le lendemain matin à 07 heures elles ont été refermées.

Les contrôles ont été imprégnés avec de l'acétone puis traités comme les bouteilles de test d'insecticide. Pour l'expérience, 20 à 25 femelles âgées de 3 à 5 jours et non gorgées de sang ont été introduites dans la bouteille puis le *Knock down* évalué pendant une heure et la mortalité reportée pendant 24, 48 et 72 heures après exposition. Après exposition, les moustiques ont été nourris au glucose 5% et gardés dans les conditions de laboratoire. Pour reporter la mortalité, des fiches de collecte de données ont été élaborées à cet effet (voir annexe).

II.1.3. Deuxième partie: Evaluation de l'efficacité en phase II (cases expérimentales)

II.1.3.1. Description de la case expérimentale

Les cases expérimentales sont des cases qui simulent des maisons où le nombre de moustiques entrés, exophiles, morts, à jeun ou gorgés de sang peut être déterminé. Elles sont aussi caractérisées par la présence des chicanes et de véranda piège, de rigoles autour contenant de l'eau, pour les protéger des fourmis. Les cases expérimentales permettent d'étudier principalement l'efficacité des traitements en termes d'inhibition du repas de sang, de dissuasion, d'induction de l'exophilie et de mortalité sur les moustiques de milieu naturel.



Figure 4: Vue de face d'une case expérimentale et sa véranda piège

II.1.3.2. Application de l'insecticide et évaluation

II.1.3.2.1. Pulvérisation et insecticides utilisés

Les traitements suivants ont été appliqués :

1. Case contrôle (pulvérisée avec l'eau distillée)
2. Chlorfénapyr SC 240g/L (BASF[®]) à 150mg/m²
3. Chlorfénapyr SC 240g/L (BASF[®]) à 250mg/m²
4. Alpha-cyperméthrine à 30mg/m²
5. Mélange de Chlorfénapyr 150mg/m² et d'alpha-cyperméthrine 30mg/m²
6. Mélange de Chlorfénapyr 250mg/m² et d'alpha-cyperméthrine 30mg/m²
7. Bendiocarb à 0,2 g/m².

Les différents insecticides ont été appliqués sur les murs et le plafond selon les doses en utilisant une pompe à pression calibrée d'un débit de 800ml/min. Des essais à blanc ont permis le calibrage de la pompe. Pour le calibrage de la pompe nous avons utilisé de l'eau distillée avant l'application de l'insecticide dans les cases expérimentales mesurant 2m x 0,70m. C'est après cette phase que les solutions d'insecticides ont été préparées et pulvérisées dans les cases correspondantes.

II.1.3.2.2. Evaluation en case expérimentale

Au total 7 cases expérimentales ont été utilisées avec les insecticides et eau ci-dessus cités. Les murs et le plafond des cases ont été pulvérisés avec les doses d'insecticides cités ci-haut à l'aide d'une pompe calibrée.

Les insecticides étaient en poudre (Bendiocarb) et en suspension concentrée (CFP et Alpha-cypermethrine). Le bendiocarb qui était en poudre a été dissout au préalable dans l'eau distillée avant d'être mesuré. Les différentes quantités d'eau et d'insecticides ont été augmentées (3x) afin d'avoir une quantité suffisante de produit dans la pompe permettant d'avoir une bonne pression de 56 Kpa et le débit souhaité à la pompe.

Après la pulvérisation, nous avons procédé à la sélection de 7 personnes volontaires sans distinction de sexe (hormis les femmes enceintes et allaitantes) parmi les habitants des localités autour du site. Chacun d'eux a passé une nuit successivement dans les 7 cases selon une rotation latine et un repos le 8^{ème} jour. La sélection des volontaires s'est effectuée après un accord préalable du responsable du District sanitaire. Ils ont été informés des objectifs de l'étude et ont à l'issue de l'entretien signé un consentement éclairé devant un témoin s'ils sont illettrés.

II.1.3.3. Collecte des moustiques et détermination des paramètres entomologiques

Quarante-huit heures après la pulvérisation, les volontaires ont commencé à dormir dans les cases le soir à partir de 20 heures pour se réveiller le lendemain à 07 heures. Le matin, tous les moustiques (vivants et morts) ont été collectés à l'intérieur de la case (murs, plafond, véranda) à l'aide de tubes, de pinces et de torches.

Les tubes ont été placés dans des sacs étiquetés mur, plafond et véranda-piège puis rangés dans des glacières portant le numéro de chaque case. Les sacs portaient les mentions suivantes: le numéro de case et le lieu de capture des moustiques.

Les moustiques ont été transportés au laboratoire puis identifiés morphologiquement grâce à la clé de Gillies & Coetzee (1987) [46] par un technicien entomologiste expérimenté.

Ils ont été séparés et classés selon leur espèce, leur statut en vivant ou mort, leur état physiologique en gorgés de sang ou à jeun, et leur sexe. Seules les femelles d'*An. gambiae s.l.* vivantes ont été placées dans des gobelets puis nourries avec un tampon de glucose 5%. Elles ont été observées pendant 72 heures pour reporter la mortalité différée par jour.

II.1.3.4. Bioessais

a) Test en cône ou de rémanence

Les tests en cône OMS ont été réalisés sur les surfaces traitées 24 heures (0), 1, 2 et 3 mois après la pulvérisation pour évaluer la rémanence des différents insecticides utilisés.

Les femelles adultes d'*An. gambiae* Kisumu élevées à l'insectarium et les femelles d'*An. gambiae s.l.* de VK7 âgées de 3 à 5 jours et non gorgées de sang, ont été testées en cône pendant 2 heures selon les recommandations de l'OMS. Pour la réalisation du test, des cônes propres, du coton, un aspirateur, du ruban adhésif, des marqueurs et du glucose 5% ont été utilisés.

b) Procédure

Pour le test en cône, 10 à 15 femelles âgées de 3 à 5 jours, ont été aspirées puis placées dans des gobelets une heure avant le test. Pendant ce temps nous avons procédé à la fixation et à l'étiquetage des cônes sur les murs qui ont été ensuite bouchés au coton. Les moustiques ont été ensuite transférés dans les cônes pour être en contact avec la surface traitée à l'aide d'un aspirateur. Chaque test a duré 2 heures. Dix (10) cônes/case ont été nécessaires pour la réalisation du test en cône à raison de 5 cônes pour la souche sensible *An. gambiae* Kisumu et 5 cônes pour *An. gambiae s.l.* de VK7. Deux aspirateurs dont un pour le contrôle et un pour les cases traitées ont été utilisés pour éviter de biaiser la mortalité des moustiques du contrôle.

Le test s'effectuait toujours en commençant par la case contrôle. A la fin du test, les moustiques ont été retirés puis transférés dans des gobelets, nourris au glucose 5% puis transportés aussitôt dans le véhicule environ 30 minutes à l'insectarium, couverts par une serpière mouillée. Ils ont été élevés dans les conditions de l'insectarium. La mortalité a été enregistrée à 24, 48 et 72 heures après exposition. L'humidité relative et la température d'exposition ont été prises en utilisant un thermo-hygromètre.



Figure 5: Test en cône en case expérimentale à VK7

c) Collecte des résidus d'insecticide

Cinq papiers filtres de 10x10cm ont été placés sur les 4 murs internes et un au plafond dans chaque case expérimentale avant la pulvérisation. Un jour (soit 24 heures) après la pulvérisation, un lot de 35 papiers filtres a été enlevé et les derniers papiers filtres à la fin de l'étude intervenue le 03 Décembre 2013. Ils ont été emballés dans du papier aluminium, gardés au frigo à +4°C puis expédiés en Belgique pour des analyses biochimiques afin de déterminer la concentration effective des insecticides après pulvérisation.

Au cours de l'évaluation, les endroits où les papiers filtres ont été enlevés ont été évités pour les tests en cône et un moustique pris dans ces espaces devait être signalé.

II.1.3.5. Analyses statistiques

Les données ont été saisies sur Microsoft Excel version 2007 et analysées sur le logiciel Graph pad prism version 5.00 avec un degré de significativité de 5%. Pour la validité du test bioessai, la mortalité du contrôle devait être inférieure à 5%, sinon la formule d'Abbott était appliquée pour corriger la mortalité des traitées lorsque celle du contrôle était située entre 5 à 20%.

Des analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la loi de Poisson GLM (Generalized Linear Model) avec R.2.12.

Toutes les données proportionnelles ont été analysées en utilisant la loi Binomiale GLM pour vérifier le lien existant entre les paramètres étudiés. En plus, One-way ANOVA et le test de Tukey ont été utilisés pour comparer les paramètres deux à deux.

II.2. Considérations éthiques

Le présent protocole de recherche a eu l'approbation du comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ avant sa mise en œuvre.

Les participants ont reçu toutes les informations concernant l'étude. Les volontaires ont donné leur consentement libre, éclairé puis signé pour participer à l'étude.

II.3. RESULTATS

II.3.1. Détermination de l'efficacité en phase I (au laboratoire)

Les tests d'efficacité en bouteille au laboratoire du CFP, de l'Alpha-cyperméthrine et du bendiocarb ont été réalisés.

Le CFP avec la souche sensible *An. gambiae* Kisumu a montré une mortalité de 8% pour le contrôle et une mortalité comprise entre 95 et 100% pour les bouteilles traitées avec les concentrations de 0,125% à 4% en soixante-douze heures (72h) après exposition (Figure 6a).

Il a montré aussi bien une bonne efficacité sur les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes du milieu naturel *An. gambiae s.l.* de VK7, avec une mortalité fluctuant entre 92 à 100% en soixante-douze heures (72h) après exposition aux doses 0,125% à 4%. (Figure. 6b). A ces tests se sont ajoutées d'autres séries de tests avec des doses amendées allant de 0,0039 à 0,0125% pour le CFP. Avec ces dernières doses, la mortalité avec *An. gambiae* Kisumu a varié entre 93 à 100% (Figure 7a) et avec les moustiques de milieu naturel entre 86 et 99% (Figures 7b) dans les bouteilles traitées et en 72h après exposition.

Avec les résultats obtenus dans les tests en bouteille avec le CFP, la dose létale (DL), concentration qui tue 50% des moustiques s'avère être en dessous de 0.0039% et la LC 90 entre 0.0625 et 0.125% avec les deux espèces de moustiques utilisés.

Les résultats obtenus avec l'Alpha-cyperméthrine ont montré une mortalité avec *An. gambiae* Kisumu, de 9,6% pour le contrôle et de 100% pour les bouteilles traitées avec les concentrations de 0,00625% à 0,2% (Figure 8a) et en 72h après exposition.

Nos résultats montrent avec les moustiques *An. gambiae s.l.* de VK7, une mortalité de 0% pour le contrôle et entre 31 et 100% pour les traitées aux mêmes doses de 0,00625 à 0,2% (Figure 8b) et en 72h d'observation. Des concentrations amendées d'Alpha-cyperméthrine ont également été testées et ont montré une mortalité de 88 à 100% avec la souche sensible *An. gambiae* Kisumu (Figure 9) en 72 h après exposition.

Ces taux de mortalité ont été corrigés par la formule d'Abbott.

Quant au bendiocarb 0,1%, il a donné une mortalité totale avec les deux espèces sensibles et résistantes (Figures 10a et 10b) en 72 h après exposition.

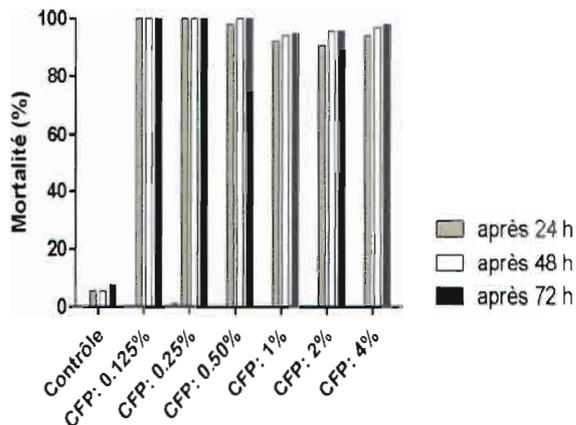


Figure 6a: Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu testée avec le CFP en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

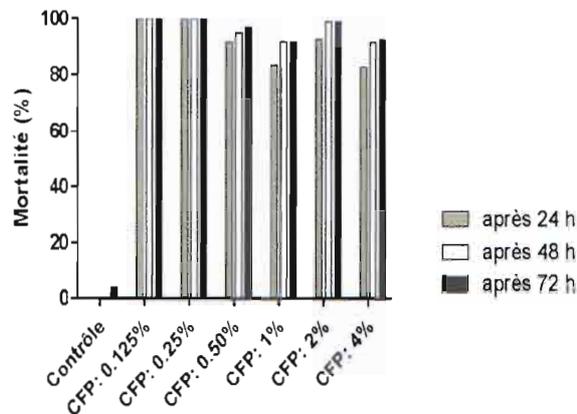


Figure 6b: Mortalité d'*An. gambiae s.l.* de VK7 testée avec le CFP en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

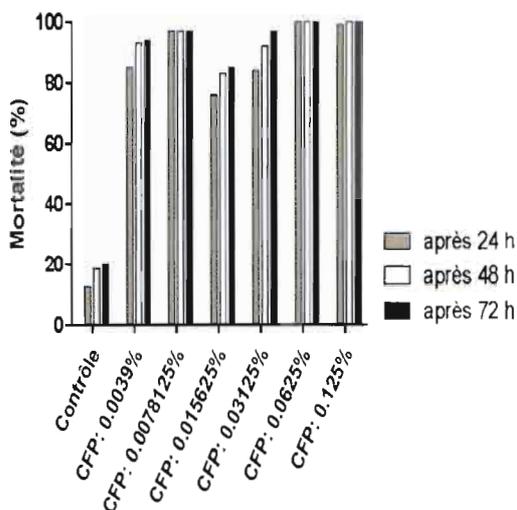


Figure 7a: Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu testée avec le CFP aux doses amendées en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

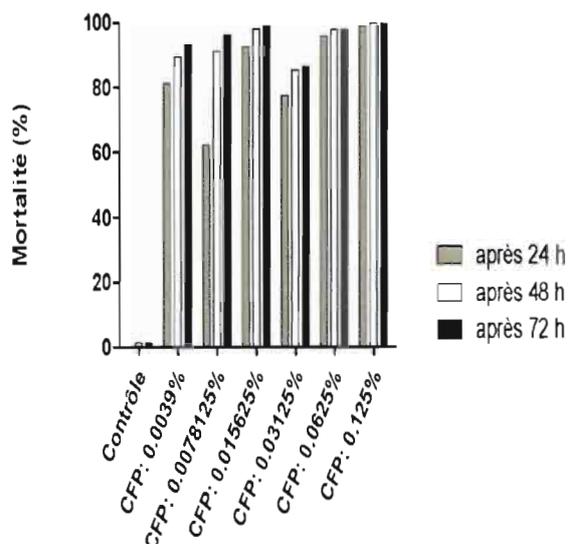


Figure 7b: Mortalité d'*An. gambiae s.l.* de VK7 testée avec le CFP aux doses amendées en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

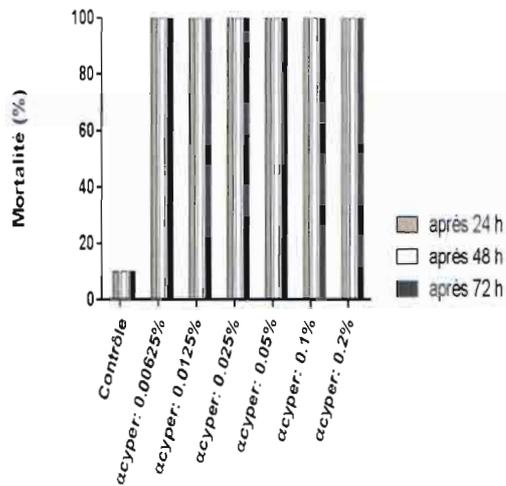


Figure 8a: Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu testée avec Alpha-cyperméthrine en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

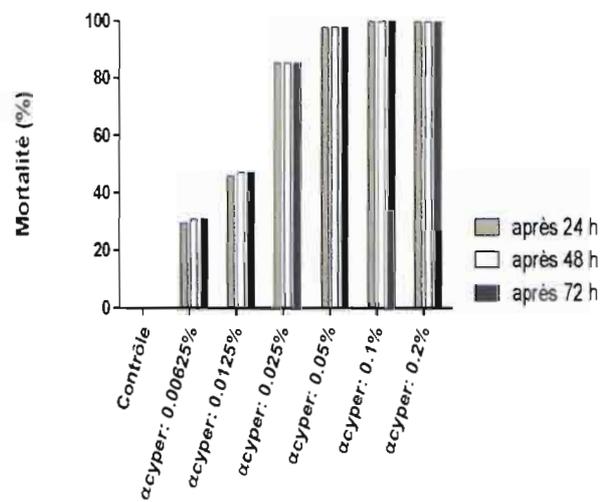


Figure 8b: Mortalité d'*An. gambiae s.l.* de VK7 testée avec Alpha-cyperméthrine en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

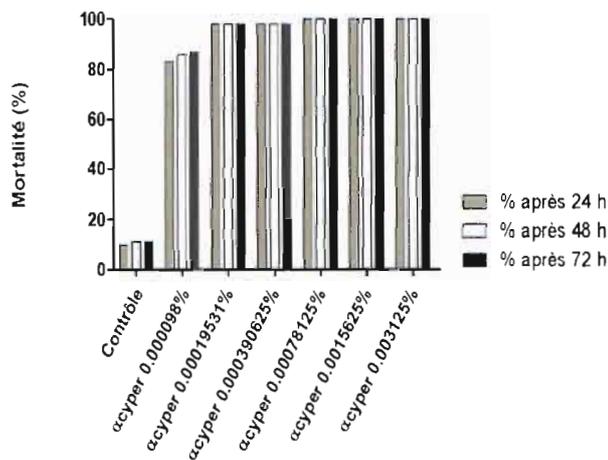


Figure 9: Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu testée avec Alpha-cyperméthrine en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

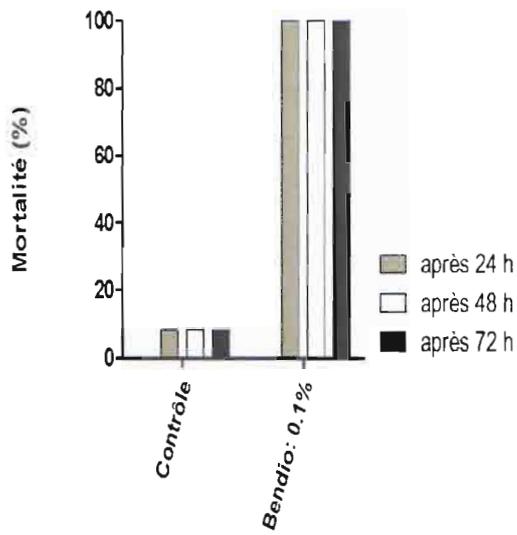


Figure 10a: Mortalité d'*An. gambiae* Kisumu testée avec le bendiocarb en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation

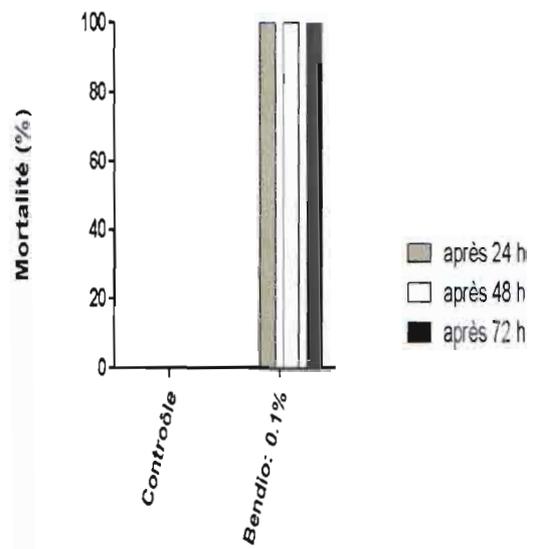


Figure 10b: Mortalité d'*An. gambiae* s.l. de VK7 testée avec le bendiocarb en test en bouteille de 24 à 72 heures après observation



II.3.2. Evaluation de l'efficacité en phase II

II.3.2.1. Détermination des paramètres entomologiques dans les cases expérimentales

Au cours de cette étude, les paramètres entomologiques mesurés sur 20184 moustiques tels que l'effet dissuasif ou déterrence, la prise de repas de sang, l'inhibition du repas de sang, la mortalité et l'exophilie des moustiques *An. gambiae s.l.* de VK7 ont été évalués.

L'effet dissuasif obtenu dans les cases d'Alpha-cyperméthrine 30 mg/m² seule a varié entre 4 et 40% et en combinaison avec le CFP 150 et 250 mg/m² entre -19 et 71%. Dans la case de Bendiocarb 0,2g/m², cet effet a varié de -1 à 22%) en soixante-douze heures (72h) après exposition durant les 4 mois d'évaluation.

Durant les 4 mois d'évaluation, les taux de prise de repas de sang ont varié de 70 à 90% tandis que l'inhibition du repas de sang entre 0 et 27% en soixante-douze heures (72h) après exposition. L'exophilie corrigée quant à elle, a varié entre 27 et 67%.

Pour les taux de mortalité corrigée, ils ont varié de 0 à 51% en soixante-douze heures (72h) après exposition durant les 4 mois d'évaluation (Figure 15 et tableaux 1 à 5).

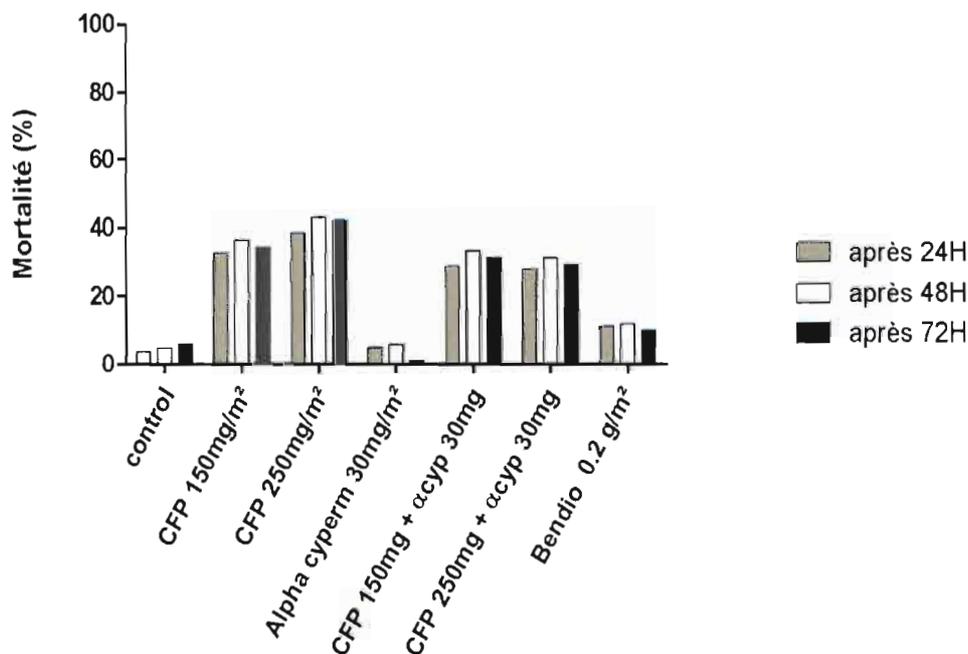


Figure 11: Mortalité d'*An. gambiae s.l.* de VK7 collectée pendant les 4 mois comparée au contrôle en 24 à 72 heures d'observation.

Tableau 1: Répartition des moustiques *An. gambiae s.l.* collectés dans les cases expérimentales en Août 2013

	Case 1/ Control	Case 2/CFP 150 mg/m ²	Case 3/CFP 250 mg/m ²	Case 4/Alpha- cyperméthrine 30mg/m ²	Case 5/CFP150mg/m ² + Acycperméthrine 30mg/m ²	Case 6/CFP 250mg/m ² + Alpha-cyperméthrine 30mg/m ²	Case 7/Bendiocarb 0.2g/m ²
Total femelles	707	904	938	619	744	798	549
% Déterrence	-	-28	-33	12	-5	-13	22
% Gorges de sang	84	82	83	95	86	85	90
95% CI	(63,74-100)	(59,69-100)	(63,69-100)	(90,55-100)	(77,44-96,28)	(68,27-99,63)	(79,01-100)
% inhibition de gement	-	2	1	0	0	0	0
% mortalité après 24h	4	39	45	4	32	32	24
95% CI	(1,00-6,07)	(29,29-78,80)	(27,56-65,32)	(0,81-5,56)	(10,68-51,48)	(13,04-55,91)	(0-43,76)
% mortalité après 48h	5	44	51	5	38	36	26
% mortalité corrigée ès 48h	-	41	48	0	35	33	22
95% CI	(2,92-5,78)	(33,89-53,06)	(32,79-72,81)	(2,21-6,18)	(17,69-56,71)	(18,58-57,81)	(0-46,04)
% mortalité après 72h	5	46	54	6	40	39	27
% mortalité corrigée ès 72h	-	44	51	0	37	36	23
95% CI	(2,92-6,75)	(36,5-55,12)	(37,36-74)	(1,64-8,97)	(19,81-60,17)	(20,55-62,99)	(1,81-45,61)
% Exophilie	37	37	42	39	45	40	34
95% CI	(13,3-54,3)	(11,25-56,47)	(4,77-70,04)	(33,69-43,98)	(34,48-53,76)	(36,6-64,66)	(16,29-47,15)

Tableau 2: Répartition des moustiques *An. gambiae s.l.* collectés dans les cases expérimentales en Septembre 2013

	Case 1/ Control	Case 2/CFP 150 mg/m ²	Case 3/CFP 250 mg/m ²	Case 4/ Alpha- cyperméthrine 30mg/m ²	Case 5/CFP 150mg/m ² + acyperméthrine 30mg/m ²	Case 6/CFP 250mg/m ² + acyperméthrine 30mg/m ²	Case 7/ Bendiocarb 0.2g/m
Total Femelles	1206	1461	1444	1155	1437	1372	1214
Déterrence	-	-21	-20	4	-19	-14	-1
Gorges de sang	90	83	89	90	84	89	86
% CI	(82,09-100)	(74,1-98,48)	(83,57-94,54)	(74,74-100)	(69,69-95,97)	(78,72-96,16)	(74,91-96,21)
Inhibition du gorgement	-	7	1	0	6	2	5
mortalité après 24h	4	33	36	5	27	27	8
% CI	(0,52-6,61)	(22,63-36,01)	(21,99-45,84)	(0-14,21)	(9,51-42,96)	(20,58-51,6)	(0,55-12,12)
mortalité après 48h	6	37	40	6	31	31	9
mortalité corrigée après 48h	-	33	36	0	27	27	4
95% CI	(1,58-8,98)	(25,13-40,14)	(22,59-49,69)	(0-15,32)	(13,25-46,33)	(19,46-38,85)	(0-13,59)
mortalité après 72h	7	39	43	7	33	33	14
mortalité corrigée après 72h	-	34	38	0	27	28	7
% CI	(1,81-11,53)	(20,89-42,97)	(20,1-53,06)	(0-16,26)	(8,38-48,32)	(16,86-39,6)	(0-11,57)
Exophilie	26	41	34	36	44	45	20
% CI	(22,78-29,89)	(30,78-55,34)	(18,47-53,74)	(23,25-53,55)	(32,24-60,95)	(33,65-60,24)	(22,44-34,29)

Tableau 3: Répartition des moustiques *An. gambiae s.l.* collectés dans les cases expérimentales en Octobre 2013

	Case 1/Control	Case 2/CFP 150 mg/m ²	Case 3/CFP 250 mg/m ²	Case 4/Alpha-cyperméthrine 30mg/m ²	Case 5/CFP150mg/m ² + Alpha-cyperméthrine 30mg/m ²	Case 6/CFP 250mg/m ² + αcy perméthrine 30mg/m ²	Case 7/Bendiocarb 0.2g/m ²
Total femelles	902	925	805	698	685	644	794
Déterrence	-	3	11	23	24	26	12
Gorgés de sang	88	83	78	77	72	83	81
% CI	(79.79-100)	(76.35-93.63)	(69.99-98.61)	(62.63-100)	(57.17-100)	(72.75-100)	(65.67-100)
Inhibition du gorgement	-	6	11	12	18	6	7
mortalité après 24h	3	25	35	6	29	22	6
% CI	(2.93-3.65)	(16.55-34.81)	(32.44-38.32)	(0-8.39)	(15.0-55.55)	(8.9-28.27)	(0-8.51)
mortalité après 48h	4	29	40	7	33	24	7
% CI	(3.47-4.11)	(19.16-40.27)	(36.92-46.05)	(0-8.91)	(16.89-64.35)	(16.04-39.33)	(0.36-9.37)
mortalité après 72h	5	30	42	7	34	26	9
mortalité corrigée après 72h	-	27	39	3	31	22	4
% CI	(3.36-24.24)	(20.84-37.97)	(38.14-45.76)	(0-9.80)	(19.52-64.6)	(12.51-30.99)	(0-13.58)
Exophilie	30	42	44	47	53	46	50
% CI	(18.79-35.95)	(29-55.53)	(17.58-63.85)	(14.15-66.42)	(21.87-68.11)	(31.09-59.75)	(5.30-42.67)

Tableau 4: Répartition des moustiques *An. gambiae s.l.* collectés dans les cases expérimentales en Novembre 2013

	Case 1/ Control	Case 2/ CFP 150 mg/m ²	Case 3/ CFP 250 mg/m ²	Case 4/ Alpha-cyperméthrine 30mg/m ²	Case 5/ CFP 150mg/m ² + αcyperméthrine 30mg/m ²	Case 6/ CFP 250mg/m ² + αcyperméthrine 30mg/m ²	Case 7/ Bendiocarb 0.2g/m ²
Total de femelles	42	20	37	25	12	15	32
% Deterrence	-	52	12	40	71	64	24
% Gorgés de sang	95	70	73	92	83	93	97
95% CI	(70.13-100)	(0-100)	(16.3-100)	(72.09-100)	(0-100)	(82.57-100)	(73.86-100)
% Inhibition du gorgement de	-	27	23	3	13	2	0
% mortalité après 24h	5	45	27	4	8	20	0
% mortalité corrigée après 24h	-	42	23	0	4	16	0
95% CI	(0-19.01)	(0-71.54)	(0-100)	(0-26.14)	(0-17.42)	(0-31.77)	(0-0)
% mortalité après 48h	7	45	32	4	8	20	0
% mortalité corrigée après 48h	-	41	27	0	1	14	0
95% CI	(0-19.46)	(0-69.97)	(0-100)	(0-26.14)	(0-12.83)	(0-29.92)	(0-0)
% mortalité après 72h	7	45	32	8	8	20	0
% mortalité corrigée après 72h	-	41	27	1	1	14	0
95% CI	(0-19.46)	(0-69.97)	(0-100)	(0-26.98)	(0-12.83)	(0-29.92)	(0-0)
% Exophilie	33	45	27	48	67	53	28
95% CI	(8.67-51.19)	(0-100)	(0-69.57)	(18.61-84.17)	(0-100)	(0-100)	(5.61-79.7)

Tableau 5: Récapitulatif des moustiques d'*An. gambiae s.l.* collectés dans les cases dans les cases expérimentales pendant l'étude

	Case 1/ Control	Case 2/CFP 150 mg/m ² é.a	Case 3/CFP 250 mg/m ²	Case 4/ acy perméthrine30mg/m ²	Case 5/ CFP 150mg/m ² + acy perméthrine 30mg/m ²	Case 6/ 250mg/m ² +acyperméthrine 30mg/m ²	CFP Case 7: Bendiocarb 0.2g/m ²
total femelles collectées	2857	3310	3224	2497	2878	2879	2589
% Déterrence	-	-16	-13	13	-12	1	9
% Gorgés de sang	88	83	75	88	82	86	83
95% CI	(81.97-96.53)	(69.39-89.61)	(69.85-91.65)	(75.87-100)	(71.24-91.26)	(80.44-94.56)	(77.75-93.25)
Inhibition du gorgement	-	6	15	0	7	7	3
% mortalité après 24h	4	32	38	5	29	28	11
95% CI	(2.70-5.29)	(22.82-46.68)	(20.38-49.12)	(0-7.93)	(2.58-43.142)	(13.35-35.15)	(0-25.81)
% mortalité après 48h	5	36	43	6	33	31	12
% mortalité corrigée après 48h	-	33	40	1	30	27	7
95% CI	(3.44-7.55)	(26.45-45.55)	(23.86-51.64)	(0-7.31)	(0-48.99)	(11.87-37.13)	(0-23.53)
% mortalité après 72h	6	38	45	7	35	33	15
mortalité corrigée après 72h	-	34	42	1	31	29	10
95% CI	(4.16-7.83)	(24.42-48.58)	(23.14-54.36)	(0-3.25)	(0-49.26)	(10.19-39.81)	(0-24.54)
% Exophilie	30	40	39	40	46	46	30
95% CI	(24.09-38.91)	(0-48.26)	(0-40.04)	(0.77-48.25)	(13.92-61.58)	(22.47-47.03)	(0-8.52)

II.3.2.2. Tests Biologiques ou tests de rémanence en cône dans les cases expérimentales

Des tests en cône ont été réalisés avec les espèces *An. gambiae* Kisumu et *An. gambiae s.l.* de VK7 dans les cases au cours de l'étude.

Un jour après la pulvérisation, les résultats montraient une mortalité avec *An. gambiae* Kisumu dans la case contrôle de 15%, tandis qu'elle était de 96% à 100% dans les cases de CFP 150 mg/m², 250mg/m² et Bendiocarb 0.2g/m². Et dans les cases d'Alpha-cyperméthrine 30mg/m² seule et en combinaison avec le CFP 150 mg/m² et 250 mg/m², nous avons obtenu une mortalité de 100% en 72h après exposition comparée au contrôle (Figure 12a).

Avec les moustiques *An. gambiae s.l.* de VK7 la mortalité variait entre 65 et 100% dans toutes les cases traitées en 72h après exposition comparée au contrôle qui était de 0% (Figure 12b).

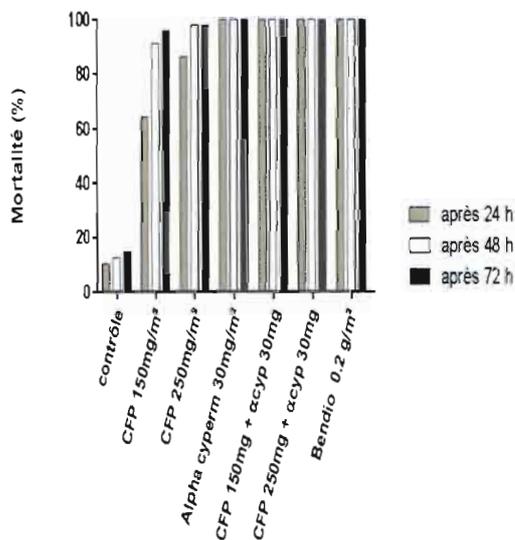


Figure 12a: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae* Kisumu en test en cône *in situ* un jour après pulvérisation en 24 à 72 heures d'observation.

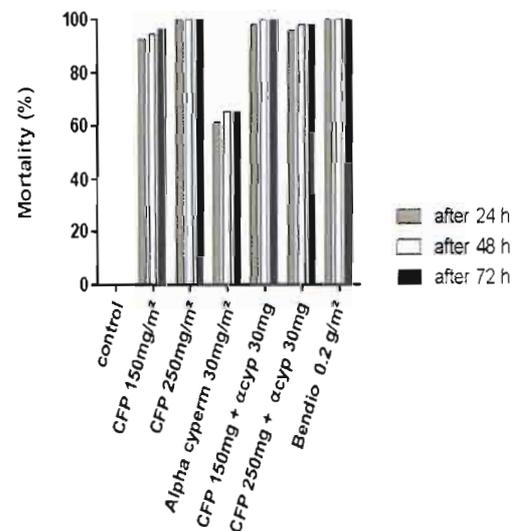


Figure 12b: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae s.l.* de VK7 en test en cône *in situ* un jour après pulvérisation en 24 à 72 heures d'observation.

Un (01) mois après la pulvérisation, les résultats montraient une mortalité avec *An. gambiae* Kisumu dans la case contrôle de 4%, tandis qu'elle variait entre 8 et 58% dans les cases de CFP 150 mg/m², 250mg/m² et de bendiocarb 0.2g/m².

Et dans les cases d'Alpha-cyperméthrine 30mg/m² seule et en combinaison avec le CFP 150 mg/m² et 250 mg/m², nous avons obtenu une mortalité entre 91 et 100% en 72h après exposition comparée au contrôle (Figure 13a).

Avec les moustiques *An. gambiae s.l.* de VK7 la mortalité variait entre 0 et 25% dans toutes les cases traitées en 72h après exposition comparée au contrôle qui était de 15% (Figure 13b).

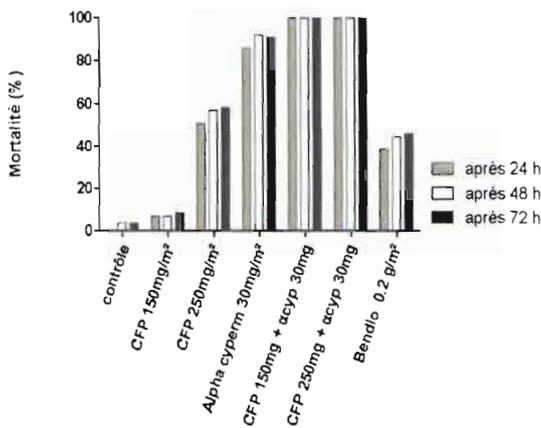


Figure 13a: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae* Kisumu en test en cône *in situ* un mois après pulvérisation de 24 à 72 heures d'observation.

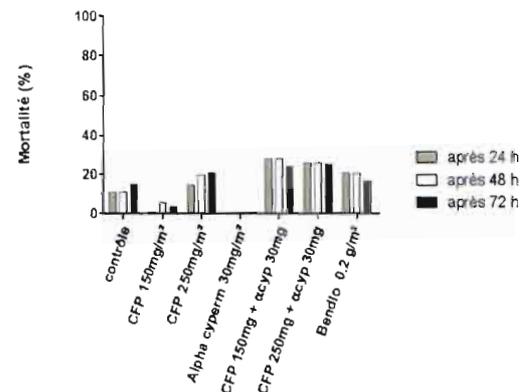


Figure 13b: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae s.l.* de VK7 en test en cône *in situ* un mois après pulvérisation de 24 à 72 heures d'observation.

Deux (02) mois après la pulvérisation, les résultats montraient une mortalité avec *An. gambiae* Kisumu dans la case contrôle de 9%, tandis qu'elle était de 0% dans les cases de CFP 150 mg/m², 250mg/m² et Bendiocarb 0.2g/m². Et dans les cases d'Alpha-cyperméthrine 30mg/m² seule et en combinaison avec le CFP 150 mg/m² et 250 mg/m², nous avons obtenu une mortalité entre 54 et 70% en 72h après exposition comparée au contrôle (Figure 14a).

Avec les moustiques *An. gambiae s.l.* de VK7 la mortalité variait entre 0 et 11% dans toutes les cases traitées en 72h après exposition comparée au contrôle qui était de 6% (Figure 14b).

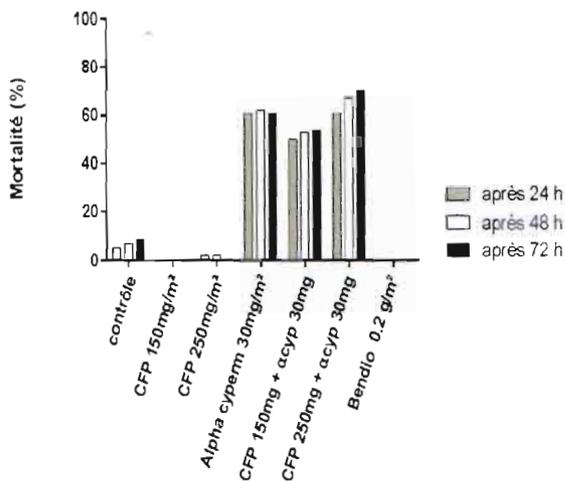


Figure 14a: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae* Kisumu en test en cône *in situ* 2 mois après pulvérisation de 24 à 72 heures après exposition.

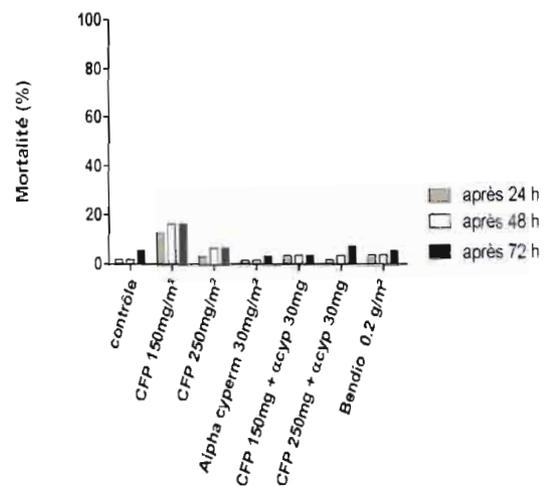


Figure 14b: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae* de VK7 en test en cône *in situ* 2 mois après pulvérisation de 24 à 72 heures après exposition.

Trois (03) mois après la pulvérisation, les résultats montraient une mortalité avec *An. gambiae* Kisumu dans la case contrôle de 14%, tandis qu'elle était de 0% dans les cases de CFP 150 mg/m², 250mg/m² et Bendiocarb 0.2g/m². Et dans les cases d'Alpha-cyperméthrine 30mg/m² seule et en combinaison avec le CFP 150 mg/m² et 250 mg/m², nous avons obtenu une mortalité entre 52 et 69% en 72h après exposition comparée au contrôle (Figure 15a).

Avec les moustiques *An. gambiae s.l.* de VK7 la mortalité variait entre 0 et 18% dans toutes les cases traitées en 72h après exposition comparée au contrôle qui était de 5% (Figure 15b).

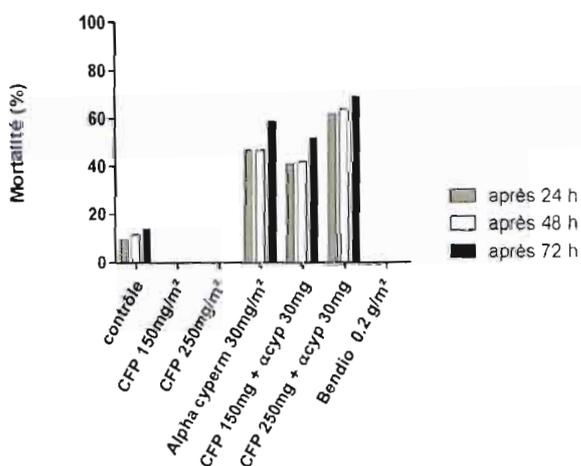


Figure 15a: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae* Kisumu en test en cône *in situ* 3 mois après pulvérisation de 24 à 72 heures après

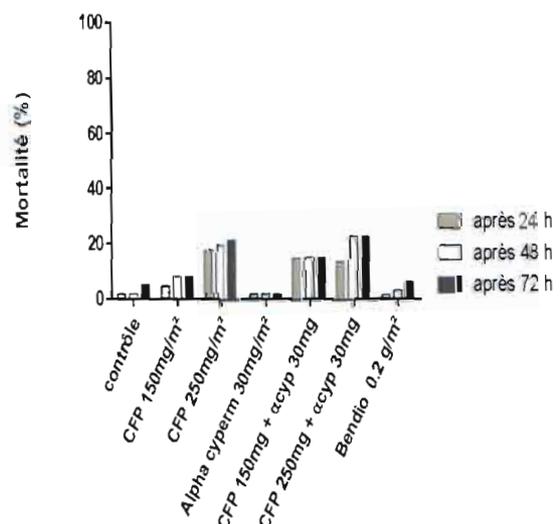


Figure 15b: Résumé de la mortalité d'*An. gambiae* de VK7 en test en cône *in situ* 3 mois après pulvérisation de 24 à 72 heures après

II.4. DISCUSSION

II.4.1. Efficacité du CFP en phase I

Les tests en bouteille avec le Chlorfénapyr (CFP), l'Alpha-cyperméthrine et le Bendiocarb, ont donné des résultats satisfaisants avec les deux espèces de moustiques utilisées à savoir la souche sensible de laboratoire: *An. gambiae* Kisumu et la souche résistante du milieu naturel: *An. gambiae s.l.* de VK7.

La mortalité d'*An. gambiae* Kisumu obtenue avec le CFP aux doses de 0,125% à 4% était de 8% dans le contrôle et de 95% à 100% dans les traitées (Figure 6a).

Avec la souche de milieu naturel *An. gambiae s.l.* de VK7 la mortalité de la bouteille contrôle était de 3,84% et celle des bouteilles traitées a varié de 92% à 100% en soixante-douze heures après exposition comparée au contrôle (Figure 7b). Cette mortalité comparée aux normes de l'OMS s'avère satisfaisante. L'efficacité d'un insecticide est montrée par la mortalité induite par ce dernier. En une heure d'exposition et après vingt-quatre heures d'observation, une mortalité avec les pyréthrinoïdes, **inférieure à 80%** indique des **individus résistants et supérieure à 98%**, une **souche sensible**. Mais une mortalité entre **80 à 97%** **montre des soupçons de résistance** des individus de la population et une vérification/confirmation est requise [47].

Les résultats **d'Alpha-cyperméthrine et de bendiocarb** ont donné une mortalité de 100% dans les bouteilles traitées avec la souche *An. gambiae* Kisumu. Ces insecticides ont donné, avec les moustiques de milieu naturel *An. gambiae s.l.* de VK7, une mortalité de 31 à 100% avec l'Alpha-cyperméthrine (Figure 8b) et de 100% avec le bendiocarb (Figures 10a et 10b) en soixante-douze heures (72h) après exposition. Etant issus d'une zone de forte résistance aux pyréthrinoïdes, cette variation de la mortalité des moustiques de milieu naturel pourrait s'expliquer par cet état de fait.

Au regard des résultats de ces différents tests en bouteille, cet insecticide (CFP) pourrait être utilisé à petites doses en santé publique dans la LAV et pourrait être d'un apport important.

II.4.2. Efficacité du CFP en phase II en milieu naturel

II.4.2.1. Déterrence ou effet dissuasif:

La déterrence que nous avons observée a varié de 0 à 13% dans les cases traitées. En terme de dissuasion, les différents résultats obtenus au cours de notre étude par rapport au contrôle étaient de 0 à 13% (13% pour l'Alpha-cyperméthrine 30mg/m², 9% pour le bendiocarb (0,2g/m²) et 1% pour le CFP 250mg+Alpha-cyperméthrine 30mg/m²). La comparaison des taux d'entrée dans les cases n'a donné aucune différence statistiquement significative par rapport au contrôle ($P>0,05$) signifiant ainsi que les moustiques étaient attirés à probabilité égale dans toutes les cases. Cela signifie aussi qu'aucun dormeur n'a été plus attractif que l'autre. Nos résultats sont contraires à ceux de N'Guessan *et al.*, (2007) [39] au Bénin, qui ont trouvé lors d'un test en tunnel que le CFP (à des doses de 50 à 1000mg/m²) induisait une réduction de la pénétration de 21% avec la souche sensible *An. gambiae* Kisumu, les moustiques résistants aux pyréthriinoïdes du Burkina Faso et une souche multi résistante d'*An. gambiae* aux organophosphorés et aux carbamates. Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par la faible rémanence de nos insecticides, elle-même due probablement à la non adhésion des insecticides sur le support ciment et plastique utilisés. Aussi, le test en tunnel de N'Guessan *et al.*, (2007) [39] a été fait dans des conditions environnementales contrôlées au laboratoire avec une moustiquaire imprégnée de CFP, tandis que nos résultats émanent du test en cases expérimentales en milieu naturel ce qui pourrait expliquer la différence observée au niveau des résultats.

II.4.2.2. Exophilie

Nos taux d'exophilie ont varié de 30 à 46% dans les cases traitées en conditions expérimentales par rapport au contrôle (30%) durant les quatre (04) mois d'évaluation. Dans notre étude seulement 39% (n=7 882) des moustiques ont été collectés dans la véranda-piège (exophiles) contre 61% (n=12 374) d'endophiles pris dans la case. La comparaison entre les différents traitements n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les traitements par rapport au contrôle ($P>0,05$) sauf avec le CFP150 et 250 mg + Alpha-cyperméthrine 30mg/m².

La combinaison du CFP à l'Alpha-cyperméthrine a manifesté un effet d'expulsion moyen des moustiques vers la véranda.

Cette même tendance a été démontrée par N'Guessan *et al.*, (2014) [48] qui ont trouvé que la moustiquaire imprégnée de mélange CFP 100 et 200mg/m² + Alpha-cyperméthrine 25 mg/m² induisait une exophilie de 75 à 76 % sur les moustiques *An. gambiae s.l.* résistants aux pyréthrinoïdes au Bénin.

Sur la totalité des moustiques gorgés collectés (n=17 187), seulement 46 % étaient exophiles contre 54 % endophiles. Ce qui signifie que les différents traitements auraient eu moins d'impact sur les moustiques en termes de dissuasion et d'expulsion vers la véranda piège. Nos résultats sont contraires à ceux trouvés par Oxborough *et al.*, (2010) [49] en Tanzanie, qui ont montré que la PID était plus effective sur les espèces restant à l'intérieur de la case pour s'y reposer. Et de plus, *An. gambiae s.s.* est supposé être plus endophagique et endophile qu'*An. arabiensis* [49]. Nos résultats pourraient être expliqués par la non persistance des insecticides sur nos murs en ciment et le plafond en plastique.

L'analyse de nos résultats montre également une différence statistiquement significative (P<0,02) entre les proportions des moustiques exophiles dans les cases traitées comparées au contrôle au cours des différents mois sauf dans les cases de CFP 250mg/m² et CFP 250mg/m² +Alpha-cyperméthrine 30mg/m².

Ce qui pourrait s'expliquer par l'action des effets environnementaux (chaleur, humidité et température) sur les moustiques au cours de l'étude.

II.4.2.3. Prise de repas de sang et inhibition du repas de sang

Nos résultats montrent un taux de repas de sang de 88% dans la case contrôle et variant entre 75 et 86% dans les traitées prouvant ainsi qu'aucune différence d'effet des insecticides utilisés par rapport au contrôle n'était significative (P>0,05). L'effet d'inhibition du repas de sang escompté est resté très faible allant de 0 à 15% montrant ainsi qu'aucun traitement n'a eu un impact significatif sur la prise de repas de sang au cours de notre étude.

Nos résultats ne diffèrent pas significativement de ceux de N'Guessan *et al.*, (2009) [50] au Bénin, qui ont trouvé au cours d'une PID une inhibition de la prise de repas de sang de 17,6% avec le CFP 1g/m² et avec *An. gambiae s.l.* malgré que la concentration soit élevée (1g/m²).

Cependant nos résultats sont contraires à ceux de N'Guessan *et al.*, (2014) [48] qui ont montré que l'inhibition du repas de sang avec *C. quinquefasciatus* et *An. gambiae*, pouvait atteindre jusqu'à 78% avec la moustiquaire imprégnée du mélange CFP + Alpha-cyperméthrine.

Nos résultats pourraient être expliqués par le fait que les insecticides utilisés n'auraient pas adhéré suffisamment sur les matériaux pulvérisés. Ainsi l'Alpha-cyperméthrine et le bendiocarb reconnus pour leur caractère excito-répulsif ne l'auraient pas manifesté.

II.4.2.4. Mortalité

Les mortalités obtenues au cours de notre étude étaient de 6% pour le contrôle et de 1 à 42% pour les traitées après soixante-douze heures (72h) d'observation au laboratoire au cours de l'étude et sur les moustiques de milieu naturel *An. gambiae s.l.* de VK7. Les plus forts taux de mortalité ont été observés avec le CFP 150mg/m² et 250mg/m² soit respectivement 34 et 42%. Cette mortalité obtenue après soixante-douze heures bien qu'intéressante reste toujours en deçà de nos attentes pour produire l'impact voulu dans la LAV à l'heure de la résistance croissante aux insecticides actuels utilisés en santé publique.

La faible adhésion, la faible rémanence des insecticides sur les supports utilisés et la dose utilisée pourraient expliquer nos résultats. Ceux-ci sont en deçà de ceux de **Ngufor et al., (2011) [51]** qui, lors de la PID, ont obtenu une mortalité moyenne de 56,7% avec le CFP 500mg/m² sur les populations d'*An. gambiae*. Cette mortalité a varié entre 82 et 83% lorsqu'ils ont combiné la PID et la moustiquaire avec le CFP 500mg/m².

II.4.2.5. Rémanence des insecticides utilisés

Au cours de notre étude, des tests bioessais ont été réalisés pour déterminer l'efficacité et l'effet résiduel du CFP, de l'Alpha-cyperméthrine et du bendiocarb en PID. Ces tests en cône ont été réalisés chaque mois avec un temps de contact de 2 heures.

La mortalité avec la souche sensible de laboratoire *An. gambiae* Kisumu, qui était de 96 à 100% dans les cases traitées, un jour après la pulvérisation, est descendue entre 0 et 69%, 3 mois après la pulvérisation et en soixante-douze heures (72h) d'exposition.

Avec les moustiques de milieu naturel *An. gambiae s.l.* de VK7 la mortalité était de 96 à 100% à vingt-quatre heures après pulvérisation et de 6 à 22%, 3 mois après pulvérisation et en soixante-douze heures (72h) après exposition.

Nous notons une dégradation rapide de nos insecticides sur les supports utilisés, ce qui aurait entraîné une décroissance de la mortalité.

Les supports sur lesquels notre PID a eu lieu ne retiendraient pas longtemps les insecticides ajoutés à la faible rémanence de ces derniers dans les cases expérimentales. Ce qui expliquerait cette baisse de la mortalité avant le quatrième mois de l'étude. Pour assurer l'efficacité du CFP sur les moustiques de terrain, une application répétée par intervalle de temps serait nécessaire.

II.4.3. Place du CFP dans le management de la résistance

Après l'analyse des différents résultats obtenus en bioessai et en cases expérimentales nous avons trouvé une efficacité du CFP au laboratoire induisant une mortalité de 100% et une mortalité moyenne de 1 à 42 % dans les cases expérimentales. Le CFP en utilisation seule s'est montré plus efficace en conditions expérimentales que lorsqu'il est combiné à l'Alphacyperméthrine. Des études menées antérieurement ont prouvé que la combinaison du CFP avec un pyréthrinolide irritant pourrait apporter une protection contre les piqûres des moustiques qui entreraient en contact avec la moustiquaire imprégnée ou la surface imprégnée [51]. Au regard de nos résultats obtenus, nous pouvons dire que le CFP pourrait être une des solutions de la LAV dans le management de la résistance dans les zones de forte résistance aux insecticides comme celle de la Vallée du Kou.

II.4.4. Limites de notre étude

Les résultats obtenus et discutés ci-haut ont fait l'objet

- d'une identification morphologique selon la clé de Gillies et Coetzee (1987) qui n'est pas une méthode aussi précise que les outils de biologie moléculaire en l'occurrence la réaction de polymérisation en chaîne,

- Et les moustiques testés et collectés sur le site n'ont pas fait l'objet de tri en PCR (polymerase chain reaction) pour évaluer les gènes de résistance, ce qui constitue des biais pour notre étude.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, le CFP a été évalué au laboratoire et en cases expérimentales dans le secteur 7 de la Vallée de Kou avec d'autres insecticides comme l'Alpha-cyperméthrine et le Bendiocarb. Dans un contexte de résistance croissante aux insecticides utilisés actuellement en santé publique, les résultats auxquels nous sommes parvenus démontrent que le CFP pourrait jouer un rôle important dans le management de la résistance aux pyréthriinoïdes. Il ne manifeste aucun effet toxique sur les mammifères selon le comité d'experts sur les insecticides à petites doses.

A la recherche de nouveaux outils de lutte anti-vectorielle comme les insecticides et au regard des résultats obtenus dans cette étude, le CFP amélioré pourrait être bien utilisé en pulvérisation intra domiciliaire ou pour l'imprégnation des moustiquaires avec une bonne efficacité.

Il peut être aussi combiné à un insecticide excito-répulsif afin d'améliorer la protection individuelle contre les piqûres des moustiques en même temps qu'il agit sur les moustiques résistants.

La PID et les MILDA, si elles sont bien menées avec de bons insecticides, pourraient contribuer à une réduction drastique de la densité anophélienne et du nombre de cas palustres dans le monde.

PERSPECTIVES

A la lumière des résultats de cette étude, les perspectives suivantes permettraient d'atteindre des meilleurs résultats avec le CFP. Il s'agit:

- d'étudier les matériaux-support à pulvériser
- de revoir les doses à pulvériser
- de mener une étude de combinaison du CFP avec les insecticides toujours actifs dans les zones d'étude.
- d'étudier la combinaison du CFP avec certains insecticides dans des moustiquaires à imprégner.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Dossier Institut National français de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Janvier 2015
- 2) World Health Organization. *World Malaria Report*: 2015. Geneva:
- 3) Données statistiques du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) 2013.
- 4) Annuaire statistique 2014 du Ministère de la Santé Burkina Faso
- 5) Kyaw M Tun, MD, Mallika Imwong, Khin M Lwin, MD, Aye A Win, MD, Tin M Hlaing, Prof, MD, Thaug Hlaing, Prof. et al. (2015). Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infectious Disease*; 15 (4): 415–421.
- 6) Diabaté A, Baldet, T Chandre, F Akogbeto M, Guiguemdé TR, Darriet, F, et al., (2002). The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67(6): 617-622.
- 7) Molly C, Reid et F Ellis McKenzie (2016). The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. *Malaria Journal* 15:107
- 8) World health Organization. *World Malaria Report*: (2014). Geneva:
- 9) Zaim M, Aitio A, Nakashima N (2000). Safety pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*, 14:1-5.
- 10) Dabiré KR., Diabaté A, Namountougou M, Toé K, Ouari A, Kengne P, et al., (2009). Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the LI014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae s.l.* from Burkina Faso (West Africa). *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103:1113-1120
- 11) Dabiré KR, Diabaté A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouédraogo JR, et al., (2008). Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malaria Journal*, 7:1886],
- 12) Harbach RE., (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin. of Entomological Research*., 94: 537-553.

- 13) Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC et *al.*, (2010). Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Medicine*, 7: e1000209.
- 14) Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF., Ouédraogo V et Carnevale P, (1985). La transmission du paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Annales.de la Société. belge de Médecine Tropicale*, 65, Suppl, 2 : 201-214).
- 15) Namountougou M, Simard F, Baldet T, Diabaté A, Ouédraogo JB, Martin T, et *al.*, (2012) Multiple Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae s.l.* Populations from Burkina Faso, West Africa. *PLoS ONE* November Issue 11 e48412.
- 16) J Brunhes et Coll., (1998). Les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel *ORSTOM Ed.*
- 17) OMS. Rapport sur le paludisme Genève 2012.
- 18) Najera JA et Zaim M (2001). Malaria vector control. Insecticides for indoor residual spraying. *World Health Organ Geneva*; WHO/CDS/WHOPES/2001.3.
- 19) Fontenille D, Lochouart L, (2006). Genetic heterogeneity of African malaria vectors. *Pierre Guillet.*
- 20) Darriet F, N'Guessan R et Carnevale P (2000). Evaluations en cages-pièges de l'effet protecteur de moustiquaires non imprégnées d'insecticide dans la prévention des piqûres d'*Anopheles gambiae s.s.* *Santé* 10:413-7.
- 21) Raghavendra K, Barik TK., Bhatt RM., Srivastava HC., Sreehari U. et Dash AP., (2011). Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malaria. Journal*;10, 16.
- 22) Djogbénou L (2009). Revue générale: lutte anti vectorielle contre le paludisme et résistance des vecteurs aux insecticides en Afrique. *Médecine Tropicale*; 69:160-164
- 23) Carnevale P, Robert V, Manguin S, Corbel V, Fontenille D, Garros C et Rogier C (2009). Les anophèles: biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte anti-vectorielle; IRD édition. *Collection Didactiques.* Marseille
- 24) Toé KH, Jones CM., N'Fale S, Ismail HM, Dabiré RK et Ranson H (2014). Increased Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors and Decreased Bed Net Effectiveness, Burkina Faso. *Emerging Infectious diseases* Vol. 20, No. 10, www.cdc.gov/eid.

- 48) N'Guessan R, Ngufor C, Kudom AA, Boko P, Odjo A, et al. (2014) Mosquito Nets Treated with a Mixture of Chlorfenapyr and Alpha-cypermethrin Control Pyrethroid Resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes in West Africa. *PLoS ONE* 9 (2): e87710. doi:10.1371/journal.pone.0087710
- 49) Oxborough RM, Kitau J, Matowo J, Mndeme R, Feston E, Boko P et al. (2010). Evaluation of indoor residual spraying with the pyrrole insecticide chlorfenapyr against pyrethroid susceptible *Anopheles arabiensis* and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Transactions of Royal Society of Tropical Medical and Hygiene*, 104 (10) 639-45.
- 50) N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Knols B, Akogbeto M, Rowland M (2009). Control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with chlorfenapyr in Benin. *Tropical Medicine and International Health*, 14:389-395.
- 51) Corine Ngufor, Raphael N'Guessan, Pelagie Boko, Abibatou Odjo, Estelle Vigninou, Alex Asidi, et al., (2011). Combining indoor residual spraying with chlorfenapyr and long-lasting insecticidal bed nets for improved control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*: an experimental hut trial in Benin. *Malaria Journal* 10: 343.

2) <http://www.who.int/malaria/en/> 12/12/2015 à 13:15

36) <http://www.admin.ch/opc/fr/official-compilation/2004/2797.pdf> 08/01/2016 à 16:47

38) http://www.afpmb.org/sites/default/files/whatsnew/2011/irac_manual.pdf. 27/02/2015 à 06:01

43): www.irac-online.org 01/03/2015 à 10:15

ANNEXES

I. Préparation des solutions stocks.

I.1. Imprégnation des bouteilles de 250ml

Matériel: bouteilles de 250 ml, solutions stocks d'insecticide, micropipette de 1000 μ l, embouts de 1ml, tables planes, gants, blouses, bavette ou cache-nez, et chronomètre.

Imprégnation:

- Sortir du frigo les solutions stocks et les laisser sur la paillasse 30mn avant le test pour qu'elles reviennent à la température ambiante.

- Etiqueter les bouteilles de 250ml avec le ruban adhésif (corps et couvercle avec les mêmes mentions): bouteille contrôle et test: nom de l'insecticide et sa concentration, date du jour

I.2. Distribution des solutions

Il faut 5 bouteilles par concentration: un contrôle et 4 bouteilles tests. Lorsqu'on utilise une seule pipette, il faut protéger juste avant la partie où s'adapte le cône avec du papier aluminium pour ne pas la contaminer. Il est préférable de commencer par la faible concentration pour finir avec la plus forte concentration.

✓ Pipeter 1ml d'acétone et le transférer dans la bouteille contrôle et fermer immédiatement pour ne pas laisser échapper l'acétone. Ensuite passer aux bouteilles d'insecticide.

✓ Distribuer 1ml de la solution stock (0,125%) avec la micropipette dans la bouteille n°1 et fermer immédiatement

✓ Pipeter 1 ml et le transférer dans la bouteille n°2,

✓ 1ml dans la bouteille n°3

✓ Et 1ml dans la bouteille n°4. Fermer immédiatement les bouteilles pour ne pas laisser échapper l'insecticide.

I.3. Imprégnation des bouteilles (contrôle et tests)

1. Pour imprégner le fond de la bouteille, faire des mouvements circulaires (rotations) en tenant la bouteille par le couvercle pendant 3mn.

2. Pour imprégner les parois internes, tenir la bouteille de façon horizontale et répandre l'insecticide par des mouvements lents. Ensuite passer au col de la bouteille en inclinant la bouteille. S'assurer que tout le col a été mouillé avant de passer au couvercle.
3. Répandre l'insecticide au fond de la bouteille et imprégner par des mouvements rotatoires pendant 3 mn.
4. Retourner le reste du liquide dans le fond de la bouteille et la répandre sur les parois internes et rouler la bouteille sur elle-même avec les 2 mains pendant 45 mn sur une surface plane.
5. Au bout des 45 mn, ouvrir en dévissant doucement le couvercle de la bouteille
6. Rouler une dernière fois la bouteille pour répandre le reste du liquide sur les parois
7. Garder ensuite les bouteilles ouvertes avec leurs couvercles à côté dans un endroit sec et à l'abri de la lumière pendant au moins 8h puis les refermer.

A noter que les bouteilles doivent être ouvertes au moins 30mn avant le début du test pour les laisser sécher. Ensuite les refermer et procéder au test.

II. Déroulement du test

Matériel: Aspirateur contrôle et test, gants, moustiques femelles non gorgées et âgées de 3 à 5 jours, fiche de report de *Kd*, cage, gobelets montés de moustiquaires étiquetés.

II.1. Procédure:

- ✓ Placer les bouteilles: Bouteille contrôle, Bouteille n°1, Bouteille 2, Bouteille 3, Bouteille 4
- ✓ Utiliser l'aspirateur contrôle pour distribuer 25 moustiques femelles dans la bouteille contrôle et l'aspirateur traité pour distribuer 25 moustiques femelles dans chaque bouteille
- ✓ Commencer par la bouteille contrôle
- ✓ Fermer immédiatement les bouteilles pour ne pas laisser s'échapper les moustiques.
- ✓ Mettre le chrono en marche dès que les moustiques sont mis dans la bouteille et noter les *Kd* à 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50 et 60 mn.
- ✓ A la fin des 60minutes, transférer les moustiques dans les cages étiquetées afin de les aspirer et les répartir dans les gobelets identifiés à cet effet.

- ✓ Placer un tampon de glucose 5% au-dessus des gobelets montés de moustiquaire et garder les moustiques en observation pendant 24h, 48h et 72h.
- ✓ Après 24h à la même heure du test, compter et retirer tous les moustiques morts du gobelet. Procéder de la même façon après 48h.
- ✓ Pour les moustiques de milieu naturel *An. gambiae s.l.*, tous les morts et vivants doivent être conservés dans du silicagel bien étiquetés indiquant le nombre, le temps (morts à 24h, 48h ou 72h ou vivants après 72h), la date du jour, le nom de l'insecticide etc.
- ✓ Après 72h, compter et retirer les morts puis procéder au compte des vivants. Pour compter les vivants, il faut les placer au congélateur pendant 5mn et procéder à leur décompte rapidement.
- ✓ Etiqueter avec du ruban adhésif les cryotubes 1,5 contenant du silicagel pour conserver les moustiques avec les mentions suivantes : nom de l'insecticide+ concentration, localité de provenance des moustiques testés, nombre de moustiques, date.

NB: Mettre en moyenne 10 à 12 moustiques par tube.

Conserver les moustiques au frigo ou à la température ambiante pour d'éventuels tests ultérieurs dans les emballages bien identifiés (sachets plastiques par exemple).

Fiche de collecte des données d'évaluation

N° de case:.....

Date

Espèce: *An. gambiae*

Temps d'observation: 24h, 48, 72h

Localité: VK7

Température:

Nom du captureur:.....

Humidité:

Evaluation du Chlorfénapyr à VK7

Case...	Location	Etat	Vivant	Mort Immédiate	Réponse après 24 heures			Réponse après 48 heures			Réponse après 72 heures			Total
					Mort brut	Mort fonctionnelle	vivant	mort brute	mort Fonct	vivant	mort brute	mort Fonct.	vivant	
Traitement	case	Gorgés												
		A Jeûn												
	Véranda	Gorgés												
		A Jeûn												
	Plafond	Gorgés												
		A Jeûn												
Autres espèces	case	Gorgés												
		A Jeûn												
	Véranda	Gorgés												
		A Jeûn												
	Plafond	Gorgés												
		A Jeûn												