

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI  
UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

## Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako



### FACULTE DE PHARMACIE (FAPH)

Année universitaire : 2021-2022

Thèse N ° .....

### TITRE

**Sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* à quatre  
classes d'insecticides et fréquence allélique des  
gènes des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*  
dans deux villages du cercle de Kati**

### THESE

Présentée et soutenue publiquement le 12 /11/2022 devant le jury de la Faculté de  
Pharmacie

Par :

**M. Wesley Jefferson Maurice KONGBO GBASSINGA**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie**

**(Diplôme d'Etat)**

**Président du Jury : Professeur Sékou Fantamady TRAORE**

**Membres du Jury : Docteur Brehima DIALLO**

**Docteur Seidina A.S. DIAKITE**

**Docteur Adama DAO**

**Co-directeur de Thèse : Docteur Mamadou B. COULIBALY**

**Directeur de Thèse : Professeur Mahamadou DIAKITE**

Ce travail, effectué au Malaria Research and Training Center (MRTC) de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), a bénéficié d'un appui financier du projet Target Malaria (Projet ID N° OPP 114/988 ).

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE  
UNIVERSITAIRE 2021 – 2022**

**ADMINISTRATION**

**Doyen :** Boubacar TRAORE, Professeur

**Vice-doyen :** Sékou BAH, Maître de Conférences

**Secrétaire principal :** Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

**Agent comptable :** Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances,

**LES PROFESSEURES HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saïbou	MAÏGA	Législation

16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Mahamadou	TRAORE	Génétique
18	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

### PROFESSEURS DECEDES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique

### DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES

#### 1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
3	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
4	Alassane	DICKO	Santé Publique
5	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
6	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

|

## 2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/ Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bacteriologie-Virologie
6	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
7	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

## 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie -Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A	DIAKITE	Immunologie

12	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
17	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé Communautaire
18	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Oumar	GUINDO	Épidémiologie
6	Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environnement
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
8	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
9	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

##### 1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

## 2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

## 3. LES MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

## 4. LES ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques

11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

## DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT

### 1. LES PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie analytique <b>Chef de DER</b>
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

### 2. LES MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOM	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

### 3. LES MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

### 4. LES ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique

3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie analytique

## DER : SCIENCES FONDAMENTALES

### 1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>Chef de DER</b>

### 2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée

### 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE



N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

#### 5. CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie organique
8	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
9	Modibo	SANGARE	Anglais
10	Satigui	SIDIBE	Pharmacie vétérinaire
11	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
12	Fana	TANGARA	Mathématiques
13	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie Médicale
14	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
15	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

# **DEDICACE**

## **DEDICACE**

À mes parents, mes premiers modèles et mes premiers soutiens.

# **REMERCIEMENTS**

## **REMERCIEMENTS**

Même si cette thèse est un travail personnel, je souhaite ici rendre hommage et exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation et à son aboutissement.

### **➤ À DIEU**

L'Unique, le Parfait, le Sage, l'Omnipotent, le Miséricordieux par qui et pour qui nous sommes et à qui nous serons, de m'avoir donné la vie, la santé, et de m'avoir guidé sur le droit chemin. C'est par votre grâce que je suis arrivé à ce niveau aujourd'hui.

### **➤ À MES PARENTS**

Un grand merci à ma mère et mon père, pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique, qui m'ont permis de réaliser les études que je voulais.

### **➤ A TOUT LE CORPS PROFESSORAL DE LA FACULTE DE PHARMACIE, DE MEDECINE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE**

Pour la qualité de la formation reçue.

### **➤ À MES ENCADREURS**

Amadou GUINDO, Bilkissou YAGOURE, Sidy DOUMBIA, Lakamy SYLLA, Brehima DIALLO, Alahaye Mahamane MAÏGA, Amadou Sékou TRAORE, Mohamed Moumine TRAORE, Adama SACKO, Daman SYLLA, Daouda NIARE, Nafomon SOGOBA et Moussa KEÏTA.

Vous avez toujours répondu présent et avec enthousiasme quand j'avais besoin de vous. Vous m'avez gratifié de tant de respect. C'est le lieu de vous remercier pour tout ce que vous avez déployé comme efforts en ma faveur. Je vous souhaite une bonne carrière professionnelle.

### **➤ À TOUT LE PERSONNEL DE TARGET MALARIA**

Lakamy SYLLA, Brehima DIALLO, Diguiba Touré, Daouda NIARE, Boubacar TIMBELY, Alahaye M. MAIGA, Abdoulaye KONE, Amadou GUINDO, Sidy DOUMBIA, Yahaya KEITA, Bilkissou YAGOURE, Aissata SANOGO, Abdoulaye TRAORE, Bilkissou YAGOURE, Baba M'BARAKOU, Bakara DICKO, Souleymane KODIO, Fatoumata TRAORÉ, Hatouma SAMOURA et Kadiatou SANOGO

Je voudrais ici remercier l'ensemble du personnel de Target Malaria pour leur aide et soutien tout au long de ce travail de thèse. Je voudrais insister sur la chaleur de l'accueil, la disponibilité et la gentillesse de l'ensemble du personnel que j'ai eu l'honneur de côtoyer durant mon séjour au sein du laboratoire.

➤ **À L'ENSEMBLE DU PERSONNEL DE MRTC**

J'aimerais exprimer ma gratitude à tous les chercheurs et spécialistes, trop nombreux pour les citer, qui ont pris le temps de discuter de mon sujet. Chacun de ces échanges m'a aidé à faire avancer mon analyse.

➤ **A tous mes camarades de la 13ème promotion du numéris clausus (promotion Pr MAMADOU KOUMARE)**

Plus particulièrement Josaphat Elie YAO, Abdoul Kader SANOGO, Haled AGBERE, Placide Nelson FONGA, Kdjogbé Sonia Koba ANANI, Awo Emmanuela Hilda AMEGONOU, Gnabo Janvier Stéphane BEHINAN, Adjia Mayaka Raïssa CISSE, Barkissa NOMBRE, BARKA Najim ben, Karamoko TANGARA, Sékou AG OYE, Ag Mohamed El Moctar AL ANSARY, Akouvi Prisca DO KOKOU QUENUM, souleymane SOUMARE, YALCOUYE Abassa Indé dit Lazarré, SOGOBA Drissa, FAOUZIYA Djibril Adama, CISSE Boubacar Elmadane, DIARRA Fatoumata, Fankélé Mamadou DIARRA Djeneba Maïga, Vanessa ECOUE, Hamidou Berte, Aminata DIALLO, Gangaly SIDIBE, Sory DIARRA et à toute la famille AGBAOU de la p13.

Ce fut un agréable, chers frères et sœurs d'apprendre à vos côtés durant ces années. Vous avez été avec moi pendant les bons et mauvais moments de la vie estudiantine au point G, je vous souhaite le meilleur dans votre vie professionnelle et familiale.

**HOMMAGES AUX  
MEMBRES DU JURY**

## **A notre Maître et président du jury**

### **Professeur Sékou Fantamady TRAORE**

- **PhD en Entomologie Médicale, Professeur d'entomologie médicale**
- **Ancien Directeur du département Entomologie du centre de recherche et de formation sur le paludisme MRTC (Malaria Research and Training Center)**

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury. Nous vous remercions de votre enseignement et nous vous sommes très reconnaissants de bien vouloir porter intérêt à ce travail. Nous avons bénéficié, au cours de nos études, de votre enseignement clair et précis. Votre gentillesse, vos qualités humaines, votre modestie n'ont rien d'égal que votre compétence. Veuillez trouver ici, professeur, l'expression de nos sincères remerciements.



## **A notre Maître et juge**

### **Docteur Brehima DIALLO**

- **Docteur en Pharmacie,**
- **Master en Bio-informatique et Chercheur Assistant au MRTC**

Votre présence au sein de notre jury constitue pour moi un grand honneur. Par votre modestie, vous m'avez montré la signification morale de notre profession. Nous vous remercions de votre enseignement et gentillesse. Qu'il me soit permis de vous présenter à travers ce travail le témoignage de mon grand respect et l'expression de ma profonde reconnaissance.

## **A notre Maître et juge**

**Docteur Seidina A.S. DIAKITE**

- **Docteur en Pharmacie,**
- **PhD en Immunologie**
- **Maitre-Assistant en Immunologie à la FAPH/USTTB**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître respecté et respectable.

## **A notre Maître et juge**

### **Docteur Adama DAO**

- **PhD en Entomologie Médicale**
- **Chef de l'unité d'écologie moléculaire des vecteurs au MRTC**

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi notre jury de thèse. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude pour votre bienveillance et votre simplicité avec lesquelles vous nous avez accueillis. Veuillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de notre grande estime et de notre sincère reconnaissance.

## **A notre Maître et Co-directeur**

### **Docteur Mamadou B. COULIBALY**

- **PhD en Science Biologiques**
- **Docteur en Pharmacie**
- **Directeur Adjoint du département d'entomologie du MRTC**
- **Responsable de l'unité Génomique et Protéomique, de l'unité transgénique Target Malaria et de l'unité Laboratory of Malaria Immunology and vaccinology / Entomologie du MRTC.**

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de me confier ce travail. Je vous remercie de votre patience, votre disponibilité, de vos encouragements et de vos précieux conseils dans la réalisation de cette thèse. Votre compétence, votre dynamisme et votre rigueur ont suscité une grande admiration et un profond respect. Vos qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple. Le fait d'avoir décidé de prendre ma thèse sous votre responsabilité a été l'un des choix les plus judicieux de mes études. Veuillez croire à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect.

## **A notre Maître et Directeur de thèse**

### **Professeur Mahamadou DIAKITE**

- **Professeur Titulaire d'Immunologie-Génétique**
- **Vice-recteur de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)**
- **Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC)**
- **Chef de l'unité Immunogénétique et Parasitologie du MRTC**
- **Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la FMOS/FAPH**
- **Membre du Comité National d'Ethique pour la Santé et les Sciences**

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre compréhension et votre sens élevé pour le respect de la dignité humaine sont entre autres des qualités enviées de tous. Vous resterez pour nous un exemple à suivre. Vous avez accepté de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Les mots nous manquent pour vous remercier. Cher maître recevez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

# LISTE DES ABREVIATIONS

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**°C** : Degré Celsius

**A**: Alanine

**ace 1** : Acetylcholinesterase-1

**AChE** : Acétylcholinestérase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**An** : *Anopheles*

**DDT**: Dichlorodiphényltrichloroethane

**F1** : Première progéniture au laboratoire des femelles collectées sur le terrain

**FMOS** : Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

**GABA**: Acide Gamma-AminoButyrique

**GPIRM**: Global Plan for Insecticide Resistance Management in malaria vectors

**GST** : Glutathion-S-Transférases

**G**: Glycine

**H**: Heure

**ICER**: International Center for Excellence in Research

**K+** : ion de potassium

**KDR**: KnockDown Résistance

**L**: Leucine

**L1** : Larve de stade 1

**L2** : Larve de stade 2

**L3** : Larve de stade 3

**L4** : Larve de stade 4

**L1014F** : mutation de Leucine en Phénylalanine en position 1014

**L1014S** : mutation de Leucine en Serine en position 1014

**MII** : Moustiquaires imprégnées d'insecticide

**MILDA** : Moustiquaires imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'Action

**MRTC**: Malaria Research and Training Center

**Na+** : ion sodium

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PID** : Pulvérisations intra domiciliaires d'insecticide à effet rémanent

**P.** : *Plasmodium*

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PNLP** : Programme National de Lutte contre le Paludisme

**S:** Serine

*s.l* : *sens large*

*s.s* : *sens strict*

**USTTB** : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako



# FIGURES ET TABLEAUX

## Liste des figures

Figure 1: cycle biologique d'un Anophelinae (Photo de Sylla Daman Thèse de Médecine 2015). ....	8
Figure 2: cycle biologique du Plasmodium ( <a href="https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html">https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html</a> ) .....	10
Figure 3: Sites de collecte des moustiques endophiles .....	21
Figure 4:Collecte de moustiques endophiles à l'aide d'aspirateur de transfert .....	23
Figure 5: A-Gobelet en carton couverts par un tulle moustiquaire B-Aspirateur de transfert.....	23
Figure 6:Transfert des moustiques des cages vers les tubes d'observation (1) puis des tubes d'observation aux tubes d'exposition (2 et 3) .....	25
Figure 7:exposition des moustiques aux insecticides.....	25
Figure 8: taux de mortalité de <i>An. gambiae s.l.</i> 24 heures après exposition aux différents insecticides dans les deux villages.....	29
Figure 9: Proportions des différentes espèces de <i>An. gambiae s.l.</i> identifiées dans les deux villages...	31
Figure 10 : les différentes étapes dans la réalisation du test de sensibilité de l'OMS .....	48

## Liste des tableaux

Tableau 1: les espèces d'anophèles retrouvées au Mali (Tandina et al. 2018).....	4
Tableau 2: taux de mortalité des populations d' <i>An.gambiae s.l.</i> à Ouassorola .....	30
Tableau 3: taux de mortalité des populations d' <i>An. gambiae s.l.</i> à Sogolombougou .....	30
Tableau 4: Fréquences alléliques de la mutation <i>kdr L1014F</i> dans les deux villages.....	32
Tableau 5: Fréquences alléliques de la mutation <i>ace 1 G119S</i> dans les deux villages .....	32
Tableau 6: Fréquence allélique de la mutation <i>kdr L1014F</i> par village et par espèce .....	33
Tableau 7:Fréquence allélique de la mutation <i>ace 1 G119S</i> par village et par espèce.....	33

# TABLE DES MATIERES

## Table des matières

1	INTRODUCTION.....	1
2	OBJECTIFS .....	3
2.1	Objectif général.....	3
2.2	Objectifs spécifiques .....	3
3	GÉNÉRALITÉS.....	4
3.1	Vecteurs du paludisme.....	4
3.1.1	Cycle biologique des anophèles.....	5
3.1.2	Cycle biologique des parasites du paludisme .....	8
3.2	Lutte antivectorielle.....	10
3.2.1	Moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII).....	11
3.2.2	Pulvérisation d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations (PIH).....	12
3.3	Insecticides couramment utilisés en santé publique.....	12
3.3.1	Organochlorés .....	12
3.3.2	Organophosphorés.....	13
3.3.3	Carbamates.....	13
3.3.4	Pyréthrinoïdes de synthèse .....	14
3.3.5	Benzyolurées (perturbateurs de mues) .....	14
3.3.6	Insecticides d'origine bactérienne.....	14
3.4	Mécanismes de résistances aux insecticides .....	15
3.4.1	Résistance métabolique .....	15
3.4.2	Résistance par modification de la cible .....	16
3.4.3	Résistance par modifications comportementales .....	17
3.4.4	Résistance cuticulaire .....	19
4	Matériels et méthode .....	20
4.1	Sites et période d'étude.....	20
4.2	Critères de choix des sites.....	21
4.3	Détermination de la sensibilité d' <i>An. gambiae s.l.</i> à quatre classes d'insecticides couramment utilisés dans la lutte antivectorielle du paludisme .....	22
4.3.1	Collecte de moustiques endophiles .....	22
4.3.2	Elevage des moustiques à l'insectarium du MRTC .....	23
4.3.3	Test de sensibilité des moustiques aux insecticides .....	24
□	Interprétation des résultats.....	26
4.4	Extraction de l'ADN.....	26
4.5	Identification moléculaire de <i>An. gambiae s.l.</i> .....	26

4.6	Identification moléculaire de la mutation <i>kdr L1014F</i> .....	26
4.7	Identification moléculaire de la mutation <i>ace 1 G119S</i> .....	27
4.8	3.4.4. Détermination des fréquences des mutations <i>kdr L1014F</i> et <i>ace 1 G119S</i> .....	27
4.9	Analyse des données.....	28
4.10	Considérations éthiques .....	28
5	RESULTATS .....	29
5.1	Sensibilité d' <i>Anopheles gambiae s.l.</i> aux insecticides .....	29
5.2	Identification moléculaire d' <i>An. gambiae s.l.</i> .....	31
5.3	Fréquences alléliques des mutations <i>kdr L1014F</i> et <i>ace 1 G119S</i> .....	32
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	34
6.1	Sensibilité d' <i>An. gambiae s.l</i> aux insecticides .....	34
6.2	Fréquences alléliques des mutations <i>kdr L1014F</i> et <i>ace 1 G119S</i> .....	35
6.3	Composition de la population vectrice.....	35
6.4	Implication des résistances détectées dans la lutte antivectorielle au Mali.....	36
6.5	Limites de l'étude.....	36
7	CONCLUSION .....	37
8	RECOMMANDATIONS .....	37
9	REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	38
10	ANNEXE.....	46
10.1	Annexe1 : Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme.....	46
10.2	Annexe 2: Protocole d'extraction d'ADN avec le DNAzol .....	49

# INTRODUCTION

## 1 INTRODUCTION

Les efforts de lutte contre le paludisme ont produit des résultats remarquables quant à la réduction du fardeau mondial de la maladie au cours de ces dernières années (OMS 2021a). Au niveau mondial, le nombre de décès dus au paludisme a baissé de façon régulière sur la période 2000-2019, passant de 896 000 en 2000 à 562 000 en 2015, puis 558 000 en 2019 (OMS 2021a). En 2020, les décès ont augmenté de 12 % par rapport à 2019 pour atteindre 627 000. Il est estimé que 68 % (47 000) des 69 000 décès supplémentaires sont liés à la perturbation des services durant la pandémie de COVID-19 (OMS 2021a). Une grande part de la diminution récente de la charge mondiale du paludisme a été obtenue par le passage à plus grande échelle d'interventions de lutte antivectorielle essentielles, à savoir la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée (MILD) et la réalisation de pulvérisations intra domiciliaires d'insecticide à effet rémanent (PID) (OMS 2018).

Au Mali de 2012 à 2014, des réductions significatives de l'incidence du paludisme ont été observées dans les districts ayant bénéficié des PID au cours des 6 mois suivant chaque campagne de pulvérisation intra domiciliaire, par rapport aux districts où il y avait pas de pulvérisation intra domiciliaire, et qui ont présenté des schémas saisonniers habituels d'incidence du paludisme (Wagman et al. 2018). A titre d'exemple, les taux d'incidence cumulés des cas dans les communautés où il y a eu pulvérisation intra domiciliaire ont été réduits de 16 % dans la région de Ségou au cours des 6 mois suivant la campagne de 2016 et de 31 % dans la région de Mopti au cours des 6 mois suivant la campagne de 2017, évitant probablement un total de plus de 22 000 cas de paludisme auxquels on aurait pu s'attendre autrement pendant les mois de transmission maximale (Wagman et al. 2020).

L'usage presque universel des pyréthrinoïdes pour le traitement des moustiquaires ainsi que leur utilisation prolongée à l'instar de certaines classes d'insecticides comme les organochlorés (par exemple le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT), les carbamates et les organophosphorés pour les PID, en agriculture, ont probablement contribué à l'apparition de la résistance chez les vecteurs du paludisme (Diabate et al. 2002; Czeher et al. 2008). L'utilisation constante et extensive d'insecticides chimiques a créé une pression de sélection et favorisé le développement de résistances chez de nombreuses espèces d'insectes dans le monde (Santos et al. 2014). Les résistances aux pyréthrinoïdes, organochlorés, carbamates et organophosphorés ont été détectées chez au moins un des vecteurs du paludisme respectivement sur 68 %, 64 %, 34 % et 28 % des sites disposant de données de surveillance (OMS 2021a). Une résistance de forte intensité a été observée sur 293 sites répartis dans 27 pays sur les 38 pays ayant fourni des

données sur l'intensité de la résistance aux pyréthriinoïdes et sur les 88 pays d'endémie ayant fourni des données pour la période 2010-2020, 78 ont détecté une résistance à au moins une des classes d'insecticides chez l'un des vecteurs du paludisme et sur un site de collecte (OMS 2021a).

Une résistance à au moins une classe d'insecticides a été signalée chez au moins une espèce de vecteur du paludisme dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest (Diouf et al. 2020; Pwalia et al. 2019; Stica et al. 2019; Mint et al. 2018; Fodjo et al. 2018; Amoudji et al. 2019; Soumaila et al. 2017; Chukwuekezie et al. 2020; Koukpo et al. 2019). La situation de résistance multiple chez *An. gambiae* retrouvée au Mali avec la présence concomitante des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* est particulièrement inquiétante et constitue une menace majeure en rendant les moustiques insensibles aux insecticides qui sont indispensables pour le succès des stratégies actuelles de lutte contre le paludisme au Mali. (Sovi et al. 2020; Main et al. 2015; Keïta et al. 2020; Keïta et al. 2021; Main et al. 2018; Wragge et al. 2021; Cisse et al. 2015; Keïta et al. 2016).

S'il est évident qu'avec les différents usages des insecticides (contrôlés ou non) il est difficile voire impossible d'éviter l'installation de la résistance à tout moment, il apparaît donc crucial d'accompagner les stratégies de lutte antivectorielle contre le paludisme d'un système efficace de surveillance de la résistance aux insecticides. Cette surveillance permet une détection précoce ainsi qu'une gestion de la résistance basée sur des évidences scientifiques. C'est dans ce cadre que se situe la présente étude dont le but est d'évaluer la sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* à ces classes d'insecticides à savoir les pyréthriinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates qui sont couramment utilisés en santé publique pour la lutte antivectorielle et la fréquence allélique des gènes *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*. Elle s'inscrit dans un programme de surveillance systématique de la résistance aux insecticides pour mettre à jour la base des informations pour un déploiement rationnel des outils existants pour une lutte antivectorielle efficace contre le paludisme au Mali.



# OBJECTIFS

## 2 OBJECTIFS

### 2.1 Objectif général

Evaluer la sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* à quatre classes d'insecticides et les fréquences alléliques des gènes des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* dans deux villages du cercle de Kati

### 2.2 Objectifs spécifiques

- Déterminer la sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* à quatre classes d'insecticides
- Identifier moléculairement les espèces d'*Anopheles gambiae s.l.*
- Déterminer la fréquence allélique des gènes des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* chez *Anopheles gambiae s.l.*

# GENERALITES

### 3 GÉNÉRALITÉS

#### 3.1 Vecteurs du paludisme

Il existe 484 « espèces » d'anophèles mais seulement une soixantaine assurent la transmission des plasmodies humaines (Carnevale et al. 2017). Au Mali, Vingt-huit espèces de *Anopheles* ont été retrouvées dans diverses enquêtes entomologiques (Tableau1) (Tandina et al. 2018). *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae sensu stricto* et *Anopheles arabiensis*, qui appartiennent au complexe *Anopheles gambiae*, et le groupe *Anopheles funestus* sont les vecteurs prédominants du paludisme au Mali (Keïta et al. 2021). Les outils moléculaires utilisés pour étudier *An. gambiae s.l.* ont permis de différencier deux formes moléculaires, M et S. La forme moléculaire M fait référence à la forme chromosomique Mopti qui a été nommée *An. coluzzii* (Coetzee et al. 2013). La forme moléculaire S comprend les formes chromosomiques Bamako et Savanna (Sogoba et al. 2008; Giles 1902).

**Tableau 1:** les espèces d'anophèles retrouvées au Mali (Tandina et al. 2018)

Sous-famille	Genre	Sous-genre	Espèce/sous-espèce	Descripteur/année
<i>Anophelinae</i>	<i>Anopheles</i>	<i>Anopheles</i>	<i>An. coustani</i>	Laveran, 1900
			<i>An. obscurus</i>	Grünberg, 1905
			<i>An. paludis</i>	Theobald, 1900
			<i>An. ziemanni</i>	Grünberg, 1902
		<i>Cellia</i>	<i>An. arabiensis</i>	Patton, 1905
			<i>An. brohieri</i>	Edwards, 1929
			<i>An. brunnipes</i>	Theobald, 1910
			<i>An. coluzzii</i>	Coetzee ;Wilkerson, 2013
			<i>An. domicola</i>	Edwards, 1916
			<i>An. flavicosta</i>	Edwards, 1911
			<i>An. funestus</i>	Giles, 1902
			<i>An. gambiae</i>	Giles, 1902
			<i>An. hancocki</i>	Edwards, 1929
			<i>An. lesoni</i>	Evans, 1931
			<i>An. longipalpis</i>	Theobald, 1903
<i>An. maculipalpis</i>	Giles, 1902			

			<i>An. maliensis</i>	Bailly-Choumara & Adam, 1959
			<i>An. nili</i>	Theobald, 1904
			<i>An. pharoensis</i>	Theobald, 1901
			<i>An. pretoriensis</i>	Theobald, 1903
			<i>An. rhodesiensis</i>	Theobald, 1901
			<i>An. rivulorum</i>	Leeson, 1935
			<i>An. rufipes rufipes</i>	Gough, 1910
			<i>An. rufipes broussesi</i>	Edwards, 1929
			<i>An. sergentii sergentii</i>	Theobald, 1907
			<i>An. sergentii macmahoni</i>	Evans, 1936
			<i>An. schwetzi</i>	Evans, 1934
			<i>An. somalicus Rivola &amp;</i>	Holstein, 1957
			<i>An. squamosus</i>	Theobald, 1901
			<i>] An. wellcomei wellcomei</i>	Theobald, 1904

### 3.1.1 Cycle biologique des anophèles

Il comporte quatre stades distincts : œuf, larve, nymphe et adulte (Figure 1). Le temps nécessaire pour le développement à chacun des stades dépend de la température et de facteurs nutritionnels. Ainsi la durée de chaque stade se raccourcit à mesure que la température augmente.

#### 3.1.1.1 Œufs

L'anophèle femelle ne s'accouple normalement qu'une seule fois dans sa vie et a généralement besoin d'un repas de sang après l'accouplement pour que les œufs puissent se développer. Elle prend en général des repas de sang tous les deux ou trois jours, avant la ponte suivante. Elle dépose à chaque ponte de 100 à 150 œufs environ à la surface de l'eau. Les sites de ponte sont très variables : petites empreintes de sabots d'animaux, flaques d'eau de pluie, cours d'eau, marécages, canaux, rivières, mares, lacs, rizières et, parfois, même de l'eau sale. Chaque espèce d'anophèle préfère pondre dans un type d'habitat particulier. Sous les tropiques, dans les conditions les plus favorables, les anophèles femelles ont une longévité moyenne de 3 à 4 semaines. Elles pondent tout au

long de leur vie, produisant de 1 à 3 pontes pour la plupart, mais jusqu'à 7 pontes dans certains cas (OMS 2014).

### 3.1.1.2 Larves

Les œufs éclosent au bout de 1 à 2 jours, libérant les larves-qui flottent en général parallèlement à la surface de l'eau, juste en dessous, car elles ont besoin d'air pour respirer. Elles se nourrissent des particules alimentaires en suspension. Elles plongent rapidement si elles sont dérangées mais doivent revenir sans tarder à la surface pour respirer. Il y a quatre stades larvaires. Le premier est celui de la petite larve émergeant de l'œuf. Après 1 jour ou 2, elle mue et passe ainsi au second stade, suivi par le troisième et le quatrième stade à des intervalles d'environ deux jours chacun. La larve reste au quatrième stade pendant 3 à 4 jours, avant de devenir une nymphe. La durée totale du stade larvaire est en général de 8 à 10 jours aux températures normales de l'eau en milieu tropical. À des températures plus basses, le développement des stades aquatiques prendra plus de temps (OMS 2014).

### 3.1.1.3 Nymphes

À ce stade, une transformation majeure intervient, l'insecte devant passer de la vie aquatique de la larve à la vie aérienne de l'adulte. La nymphe est en forme de virgule. Elle ne s'alimente pas, reste sous la surface de l'eau et plonge au fond si elle est dérangée. Le stade nymphal dure de 2 à 3 jours, après quoi le tégument se fend. Le moustique adulte émerge alors et se repose temporairement à la surface de l'eau avant de prendre son envol (OMS 2014).

### 3.1.1.4 Adultes

L'accouplement a lieu peu après l'émergence du moustique adulte. La femelle ne s'accouple en général qu'une seule fois, parce qu'elle reçoit à ce moment-là suffisamment de sperme pour féconder les œufs de toutes les pontes successives. Normalement, le premier repas de sang n'est pris qu'après l'accouplement, mais il arrive que des femelles encore vierges s'alimentent. La première ponte se développe après un ou deux repas de sang (selon l'espèce), tandis que les pontes suivantes n'en nécessitent

généralement plus qu'un. Les habitudes d'alimentation et de repos des moustiques jouent un rôle très important pour les programmes de lutte antivectorielle et doivent donc être bien comprises(OMS 2014).

La plupart des anophèles piquent la nuit, certains peu après le coucher du soleil tandis que d'autres piquent plus tard, au milieu de la nuit ou même tôt le matin. Certains moustiques pénètrent dans les habitations pour piquer, on dit alors qu'ils sont endophages ; d'autres piquent surtout à l'extérieur et on les qualifie d'exophages. Après son repas de sang, le moustique se repose en général pendant une courte période. Les moustiques qui ont pénétré dans une maison se reposent habituellement sur un mur, sous le mobilier ou sur les vêtements pendus. On dit alors qu'ils sont endophiles. Les moustiques qui piquent à l'extérieur se reposent en général sur les plantes, dans des trous, dans les arbres ou sur le sol ou dans d'autres endroits frais et sombres ; on les qualifie d'exophiles(OMS 2014).

Les préférences trophiques, c'est-à-dire les hôtes de prédilection, varient selon les espèces. Certains moustiques préfèrent l'homme à l'animal et on dit d'eux qu'ils sont anthropophiles ; en revanche, s'ils ne prennent du sang que sur les animaux, on parle de moustiques zoophiles. Ceux qui préfèrent le sang humain sont les plus dangereux, car ils sont capables de transmettre l'infection dans les populations humaines. On peut trouver les adultes sur la végétation, sur des surfaces solides dans des endroits protégés, sur les rives des cours d'eau et des fossés, des trous de rochers, des caniveaux, des fissures, des grottes, des terriers, des troncs d'arbres ou des termitières (OMS 2014).

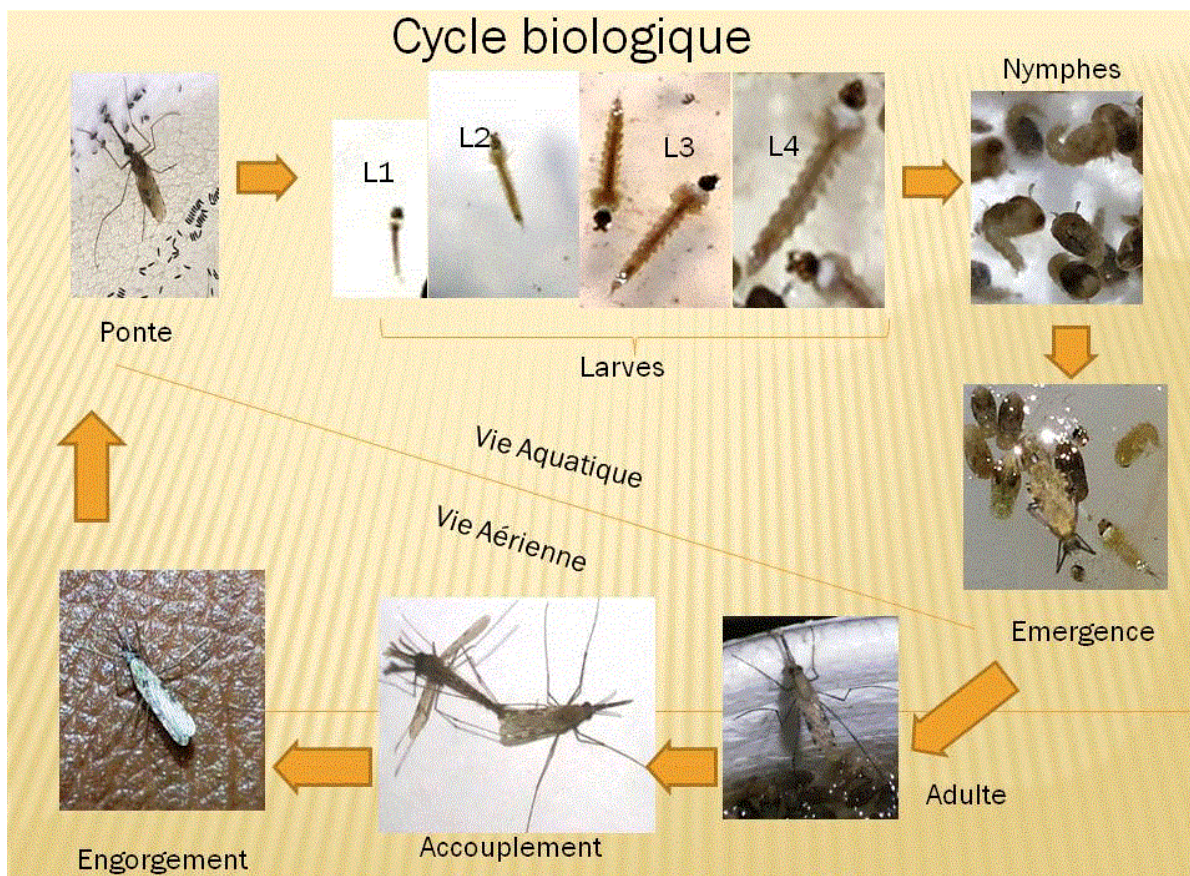


Figure 1: cycle biologique d'un Anophelinae (Photo de Sylla Daman Thèse de Médecine 2015).

### 3.1.2 Cycle biologique des parasites du paludisme

Le paludisme est dû à un protozoaire parasite, *Plasmodium*, qui passe une partie de son cycle de vie chez l'être humain et l'autre partie chez certaines espèces de moustiques. Cinq espèces de *Plasmodium* (également appelées plasmodies) sont pathogènes pour l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et le parasite du paludisme du singe, *P. knowlesi*. Parmi ces espèces, *P. falciparum* est la plus importante dans la plupart des régions tropicales et est responsable de la plus grande part des cas de maladies graves et de décès liés au paludisme. Les parasites du paludisme sont transmis par des moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles*. Les anophèles mâles se nourrissent de jus de plante et de nectar et ne peuvent donc pas transmettre le paludisme. Le cycle de vie du parasite se divise en trois phases : une se déroule chez le moustique, le cycle sporogonique; et deux chez l'hôte humain, le cycle érythrocytaire (dans les hématies humaines); et le cycle exo-érythrocytaire (en dehors des hématies) (Figure 2)(OMS 2014).



En piquant un être humain infecté, le moustique ingère des gamétocytes avec son repas de sang. Dans le tube digestif de l'insecte, les hématies (globules rouges) infectées éclatent, libérant les gamétocytes qui se développent et passent au stade sexuel mature des gamètes. Les gamètes mâles et femelles s'unissent pour former un zygote qui se développe en ookinète mobile. L'ookinète pénètre dans la paroi de l'estomac du moustique et se transforme en oocyste sphérique. À l'intérieur de l'oocyste, le noyau se divise à répétition, formant un grand nombre de sporozoïtes et entraînant un grossissement de l'oocyste. Lorsque les sporozoïtes sont complètement développés, l'oocyste se rompt et les libère dans la cavité générale du corps du moustique (l'hémocèle). Les sporozoïtes migrent alors vers les glandes salivaires. Le temps nécessaire pour le développement des sporozoïtes varie avec la température et, dans une moindre mesure, selon l'espèce plasmodiale et l'humidité ; il est en général de 8 à 15 jours (OMS 2014).

Les sporozoïtes (stade infectant de *Plasmodium* pour l'humain) se mélangent à la salive et sont injectés à un hôte humain lorsque le moustique s'alimente. Les parasites pénètrent dans la circulation sanguine et migrent vers le foie où ils se multiplient dans les hépatocytes. Pendant une période de 7 à 12 jours, la multiplication se poursuit jusqu'à l'éclatement des hépatocytes infectés. Les parasites, devenus des mérozoïtes, sont libérés dans la circulation sanguine où ils envahissent les hématies et se multiplient de nouveau. Les hématies infectées sont détruites et les parasites libérés vont envahir de nouvelles, répétant le cycle érythrocytaire. Le repas de sang est nécessaire pour assurer la maturation des œufs du moustique. Comme au cours de son existence, la femelle moustique réalise plusieurs pontes, elle aura donc plusieurs occasions de transmettre le paludisme (OMS 2014).

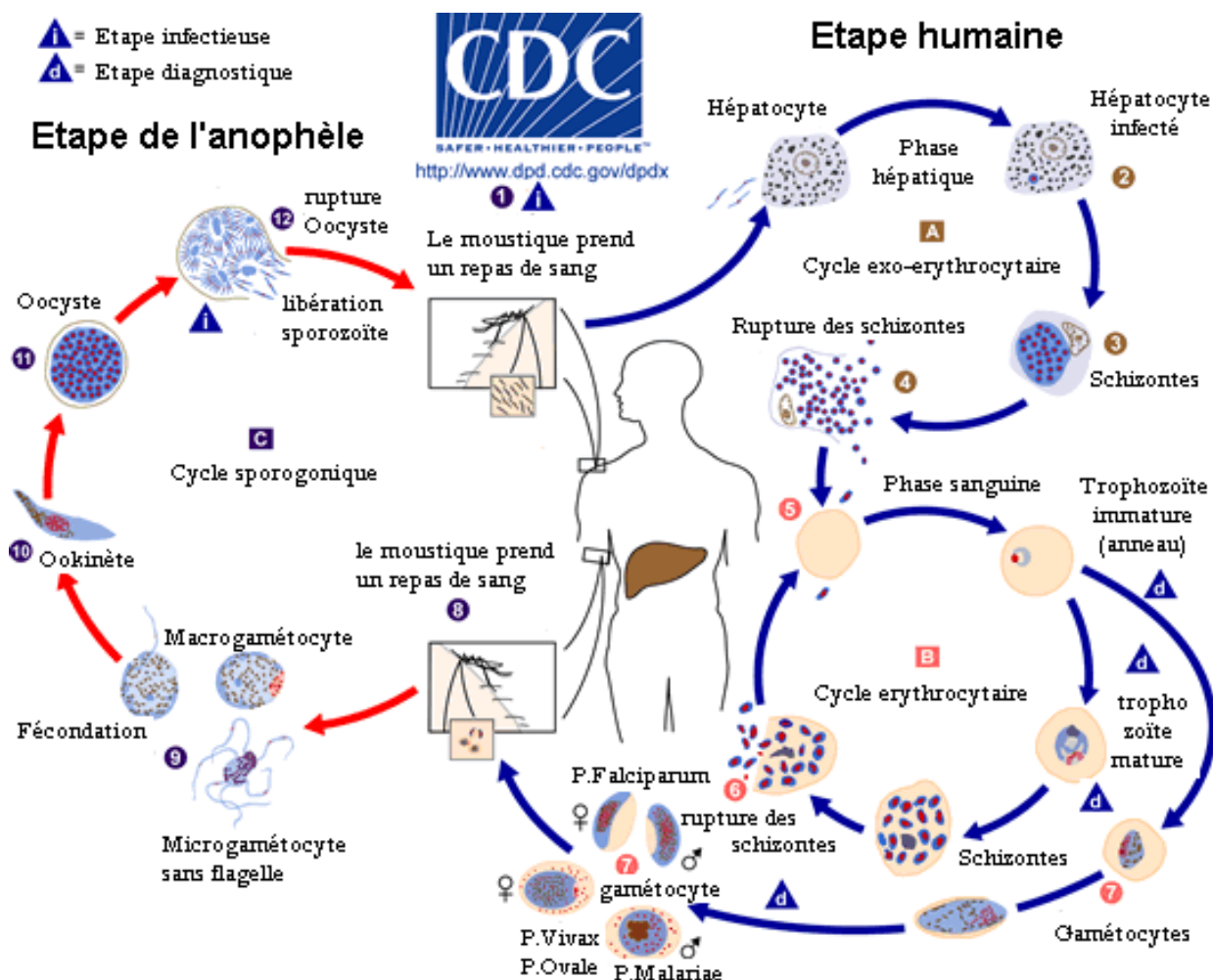


Figure 2: cycle biologique du *Plasmodium* (<https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>)

### 3.2 Lutte antivectorielle

Les interventions de lutte contre les vecteurs du paludisme qui sont recommandées pour un déploiement à grande échelle peuvent être appliquées pour l'ensemble des populations exposées au risque de paludisme dans la plupart des contextes épidémiologiques et écologiques. Il s'agit de la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) qui sont préqualifiées par l'OMS et qui, dans de nombreux endroits, restent des moustiquaires à imprégnation durable (MID) et de la pulvérisation d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations (PIH) avec un produit préqualifié par l'OMS. Il est possible d'envisager d'avoir recours à des interventions complémentaires en plus des MII et de la PIH, selon les caractéristiques de l'endroit (OMS 2021b).

Pour l'heure, l'OMS considère donc que ces deux interventions de base ont une efficacité comparable et il n'y a pas de recommandation générale visant à orienter le choix vers l'une plutôt que l'autre. Toutefois, l'association de ces interventions peut être envisagée pour

prévenir, réduire et gérer la résistance aux insecticides dans la mesure où les ressources disponibles sont suffisantes, étant donné les contraintes en matière de ressources auxquelles font face les pays d'endémie palustre (OMS 2019).

### 3.2.1 Moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII)

L'OMS recommande les MII qui restent des moustiquaires à imprégnation durable (MID) dans de nombreux contextes pour protéger les populations exposées au risque de contracter le paludisme, y compris dans les zones où le paludisme a été éliminé ou la transmission interrompue, mais où le risque de réintroduction persiste (OMS 2021b).

L'OMS distingue les trois principales catégories de MII :

- les MII conçues pour tuer les populations de moustiques sensibles à l'insecticide qui cherchent à piquer, pour lesquelles l'utilité en matière de santé publique par rapport aux moustiquaires non traitées a été démontrée et les effets entomologiques consistent à tuer les moustiques vecteurs sensibles à l'insecticide et à réduire les repas de sang. Cette catégorie comprend les moustiquaires imprégnées uniquement d'un pyréthrianoïde qui sont préqualifiées par l'OMS et les moustiquaires traitées de manière conventionnelle qui nécessitent un traitement périodique avec un kit spécifique préqualifié par l'OMS (OMS 2021b).
- les MII conçues pour tuer les moustiques résistants à l'insecticide qui cherchent à piquer, pour lesquelles l'utilité en matière de santé publique par rapport à l'impact épidémiologique des moustiquaires imprégnées uniquement d'un pyréthrianoïde a été démontrée pour un premier produit. Cette catégorie comprend les moustiquaires traitées avec un insecticide pyréthrianoïde et un synergiste tel que le pipéronyle butoxyde (PBO), et devrait également inclure les moustiquaires traitées avec des insecticides autres que les formulations à base de pyréthrianoïde (OMS 2021b).
- les MII conçues pour stériliser et/ou réduire la fécondité des moustiques résistants qui cherchent à piquer, pour lesquelles un premier produit doit faire la preuve de son utilité en matière de santé publique par rapport à l'impact épidémiologique des moustiquaires imprégnées uniquement d'un pyréthrianoïde. L'utilité en matière de santé publique des produits appartenant à cette catégorie reste encore à démontrer. Cette catégorie comprend les moustiquaires imprégnées d'un pyréthrianoïde et de pyriproxifène (un régulateur de croissance des insectes) et elle sera créée lorsque l'utilité en matière de santé publique d'une première MII contenant un régulateur de croissance des insectes

aura été démontrée. Il n'existe pour l'heure aucune recommandation concernant l'utilisation de ce type de moustiquaires(OMS 2021b).

### **3.2.2 Pulvérisation d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations (PIH)**

La PIH correspond à l'application d'un insecticide à effet rémanent sur les surfaces de repos potentielles des vecteurs du paludisme tels que les murs intérieurs, les avant-toits et les plafonds des habitations ou des structures (y compris les abris des animaux domestiques) où les vecteurs sont susceptibles d'entrer en contact avec l'insecticide. La PIH avec un produit qui a été préqualifié par l'OMS est recommandée pour un déploiement à grande échelle dans la plupart des zones d'endémie palustre. Le DDT, un insecticide qui n'a pas fait l'objet d'une préqualification, peut être utilisé pour la PIH si l'on ne dispose pas d'alternative aussi efficace et efficiente, et s'il est utilisé conformément à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants(OMS 2021b).

### **3.3 Insecticides couramment utilisés en santé publique**

Un insecticide est une substance active ou une préparation susceptible de tuer les insectes (ou d'autres arthropodes, tels que les acariens) leurs larves et (ou) leurs œufs. Ils appartiennent au groupe des pesticides, eux-mêmes inclus dans les biocides. Dans le monde, la très grande majorité des insecticides sont utilisés contre les insectes ravageurs de cultures ; seule une faible minorité est destinée à la lutte contre les insectes d'intérêt médical ou vétérinaire. Les familles chimiques sont liées aux modes d'action des insecticides, fondés par exemple sur la neurotoxicité de certaines molécules, sur leur impact sur la respiration cellulaire, la formation de la cuticule ou sur la perturbation de la mue. Les principaux insecticides de synthèse appartiennent à cinq familles chimiques : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes et les benzoylurées. Il existe également d'autres insecticides d'origine végétale ou bactérien (Carnevale and Robert 2009)

#### **3.3.1 Organochlorés**

Très utilisés de 1940 à 1970, leur emploi est en très nette régression. Ce sont des insecticides de contact. Les organochlorés sont des toxiques neurotropes qui altèrent le fonctionnement des canaux sodium indispensables à la transmission de l'influx nerveux. Leur spectre d'action est large. Le DDT, par exemple, agit sur l'insecte par contact et ingestion, induisant un tremblement généralisé (incoordination motrice) puis une paralysie. La toxicité aiguë des organochlorés

envers l'homme est relativement faible, dans les conditions normales d'utilisation. Ces substances sont très stables et bioaccumulables, donnant des produits de dégradation encore plus stables, peu solubles dans l'eau, d'où des problèmes d'accumulation dans les organismes et les écosystèmes via les chaînes alimentaires. Certains peuvent persister très longtemps dans les sols, les tissus végétaux et les graisses ; c'est pourquoi ils ont été interdits par la convention de Stockholm. Outre leur rémanence excessive, leur usage a été freiné par des phénomènes de résistance apparus en particulier chez les Diptères dont certains moustiques. Exemples : DDT, HCH, lindane, dieldrine, chlordécone, endosulfan (Carnevale and Robert 2009).

La déclaration de la résistance aux organochlorés dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) a diminué, vraisemblablement en raison de l'utilisation significativement réduite de cette classe d'insecticide. Le nombre de pays ayant signalé une résistance aux insecticides pour le DDT est passé de 44 en 2014 à 10 en 2020 (OMS 2021a). Le DDT, un insecticide qui n'a pas fait l'objet d'une préqualification, peut être utilisé pour la PID si l'on ne dispose pas d'alternative aussi efficace et efficiente, et s'il est utilisé conformément à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (OMS 2021b).

### **3.3.2 Organophosphorés**

Les organophosphorés sont nombreux et hétérogènes. Leur point commun est une certaine liposolubilité et un mode d'action sur le système nerveux par inhibition du 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. Exemples : dichlorvos, malathion, fénitrothion, parathion, chlorpyrifos, diazinon (Carnevale and Robert 2009).

### **3.3.3 Carbamates**

Ce vaste ensemble regroupe les dérivés de l'acide carbamique qui agissent, comme les organophosphorés, en inhibant le cholinestérase. Ils agissent le plus souvent par contact. Sauf exception, leur rémanence est généralement faible. Exemples : BPMC (2-sec-Butylphenyl N-methylcarbamate), carbaryl, propoxur, bendiocarbe, carbofuran.(Carnevale and Robert 2009)

### 3.3.4 Pyréthrinoïdes de synthèse

Insecticides dits « de troisième génération », ils sont copiés sur les pyrèthres naturels (extraits de plantes), en cherchant à augmenter leur toxicité et leur photo stabilité. Dotés d'une toxicité considérable et agissant par contact, ils tuent presque instantanément les insectes par effet choc neurotoxique, permettant de les utiliser à des doses très réduites. Comme les organochlorés, ils tuent l'insecte en bloquant le fonctionnement des canaux sodium indispensables à la transmission de l'influx nerveux. Réputés peu toxiques pour les mammifères, on leur attribue le coefficient de sécurité (rapport des toxicités pour les insectes et pour les mammifères) le plus élevé parmi les insecticides chimiques. 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. Exemples : bifenthrine, bioresméthrine, deltaméthrine, étofenprox, cyperméthrine, cyfluthrine, alphaméthrine, perméthrine, lambda-cyhalothrine (Carnevale and Robert 2009).

### 3.3.5 Benzyolurées (perturbateurs de mues)

Ces insecticides larvicides se caractérisent par un mode d'action qui perturbe la formation de la chitine. La chitine synthétase est la cible de ces perturbateurs. Les insectes meurent lors de la mue suivante. Ils sont faiblement toxiques pour l'homme. Le délai d'action est de 2 à 7 jours. Leur demi-vie est de 2 semaines. Exemples : diflubenzuron, triflumuron, etc. Insecticides d'origine végétale ces molécules sont extraites de diverses plantes par macération, infusion ou décoction. Exemples : le pyrèthre et les dérivés du pyrèthre, les roténones, la nicotine, le géranol, des alcaloïdes (Carnevale and Robert 2009).

### 3.3.6 Insecticides d'origine bactérienne

Certains bacilles Gram positif, aérobies et sporulés, comme *Bacillus thuringiensis* ou *B. sphaericus* se retrouvent dans pratiquement le sol, 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. La rémanence est faible (Carnevale and Robert 2009).

### 3.4 Mécanismes de résistances aux insecticides

Selon l'OMS, la résistance du moustique à un insecticide est la capacité de ce dernier de survivre à l'exposition à une dose standard d'insecticide ; cette capacité peut résulter d'une adaptation physiologique ou comportementale (OMS 2018).

#### 3.4.1 Résistance métabolique

Elle est caractérisée par l'augmentation de l'activité des systèmes de détoxification entraînant une dégradation rapide de l'insecticide en métabolites moins toxiques ou inactifs et plus facilement excrétés, diminuant ainsi la quantité d'insecticide atteignant la cible. De nombreuses toxines possèdent un caractère lipophile et peuvent devenir plus hydrosolubles par biotransformation dans l'insecte, et de ce fait plus facilement excrétées. Les possibilités qu'ont les insectes de dégrader les insecticides sont associées aux systèmes enzymatiques de détoxification (Haubruge and Amichot 1998).

Chez les invertébrés, les voies métaboliques concernées sont très voisines de celles décrites chez les mammifères. On y retrouve deux types de réactions classiques : les réactions de la phase I (hydrolyse et oxydation), appelées réactions de fonctionnalisation, incluent l'activation et/ou la conversion des molécules exogènes en un composé plus polaire (Haubruge and Amichot 1998). L'introduction de groupes fonctionnels augmente la solubilité dans l'eau et permet, soit leur stockage loin des tissus sensibles, soit leur excrétion (Haubruge and Amichot 1998).

Ces métabolites issus des xénobiotiques peuvent être pris en charge par les enzymes impliquées dans la phase II. Les réactions de la phase II, ou réactions de conjugaisons, qui permettent la combinaison des groupements fonctionnels ainsi introduits ou des groupements préexistants, avec des métabolites endogènes fortement hydrophiles (glycosides, glutathion ou acides aminés), ce qui en favorise l'excrétion. Dans le cas des insecticides, cette métabolisation se traduit souvent par une perte d'activité des produits avec développement de phénomènes de résistance (Haubruge and Amichot 1998).

Trois types d'enzymes participent à ce processus : les cytochromes P-450 qui introduisent un atome d'oxygène dans leurs substrats ; les glutathion-S-transférases qui catalysent la conjugaison de molécules ayant un centre électrophile avec le groupement thiol du glutathion et enfin, les hydrolases qui clivent les esters et les amides, augmentant ainsi la polarité des métabolites (Haubruge and Amichot 1998).

### 3.4.2 Résistance par modification de la cible

#### 3.4.2.1 Mutations du canal sodique voltage-dépendant

La résistance, baptisée *kdr* pour « knock-down résistance », a été observée pour la première fois dans les années 1950, suite à l'installation de la mutation chez la mouche domestique (Williamson et al. 1996). À ce jour, sept variants mutationnels (*L1014F*, *L1014S*, *L1014C*, *L1014W*, *N1013S*, *N1575Y* et *V1010L*) ont déjà été détectés chez au moins 13 espèces (*Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles sinensis*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Anopheles sacharovi*, *Anopheles culicifacies*, *Anopheles sundanicus*, *Anopheles aconitus*, *Anopheles vagus*, *Anopheles paraliae*, *Anopheles peditaenatus* et *Anopheles albimanus*) des populations des continents africain, asiatique et, plus récemment, américain, avec une prévalence élevée de *L1014F* (Silva, Santos, and Martins 2014).

Chez l'anophèle, la résistance knockdown est liée à la mutation entraînant une substitution de la leucine à la phénylalanine dans le segment S6 du domaine II du canal sodique de type para (*L1014F*) et à celle de la leucine à la sérine à la même position d'acide aminé (*L1014S*) (Verhaeghen et al. 2006; Silva, Santos, and Martins 2014). Récemment, la mutation leucine-phénylalanine a été découverte chez *An. arabiensis* dans l'ouest du Kenya (Hemming-Schroeder et al. 2018) et la mutation leucine-sérine a été trouvée chez la même espèce au Mali (Moussa Keïta et al. 2021).

Une mutation supplémentaire de l'asparagine à la tyrosine au codon 1575 dans le lieu entre les domaines III-IV du VGSC ne se produisant que sur l'haplotype *1014F* a également été documentée et l'haplotype *1014F-1575Y* a été trouvé dans les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* dans les sites d'échantillonnage d'Afrique occidentale/centrale séparés par jusqu'à 2 000 km (Jones et al. 2012).

#### 3.4.2.2 Mutation G119S du gène *ace-1*

La protéine la mieux connue en tant que cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase. Cette enzyme est indispensable au bon fonctionnement des synapses cholinergiques (Haubruge and Amichot 1998). Chez les insectes, elle se trouve essentiellement dans le système nerveux central. L'influx nerveux arrivant dans la terminaison présynaptique entraîne une libération d'acétylcholine (AChE) qui se fixe sur des récepteurs placés sur la membrane post-synaptique. Cette fixation permet l'ouverture des canaux sodium et potassium,



laquelle entraîne la dépolarisation à l'origine de l'influx nerveux sur l'élément post-synaptique (Haubruge and Amichot 1998).

Le rôle de l'acétylcholinestérase est d'hydrolyser l'acétylcholine ce qui permet la fermeture des canaux associés au récepteur du neurotransmetteur. Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique se trouve continuellement excitée. Les organophosphorés et les carbamates agissent en inhibant l'activité catalytique de l'AChE. Ils se fixent en effet sur le site actif de l'enzyme, à la place de l'acétylcholine. L'accumulation de l'AChE dans la région synaptique provoque une hyperexcitation des liaisons cholinergiques causant finalement la mort de l'insecte (Haubruge and Amichot 1998). Cette mutation résulte d'une substitution d'un seul acide aminé au codon 119 de la glycine à la sérine (G119S) et confère une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés (Weill et al. 2004).

### **3.4.2.3 Mutation du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (gaba)**

La résistance à la dieldrine chez de nombreux insectes, dont *An. gambiae* et la mouche des fruits *Drosophila melanogaster*, est conférée par une mutation du gène codant pour une sous-unité du récepteur de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), un canal chlorure (Wondji et al. 2011). La substitution de l'alanine à la glycine A296G a été observée chez *An. gambiae* et celle de l'alanine à la sérine A296S était associée à la résistance à la dieldrine chez *Anopheles arabiensis* (Du et al. 2005). Les GABA sont les cibles de nombreux insecticides organohalogénés, dont la dieldrine et le lindane (Haubruge and Amichot 1998).

### **3.4.3 Résistance par modifications comportementales**

Même si l'emploi du terme « résistance » apparaît ici inapproprié, les phénomènes d'échappement sont liés au potentiel propre au moustique de s'adapter à l'utilisation massive d'insecticides, en diminuant le contact avec celui-ci (Rubert et al. 2016). De manière parfois très complexe, l'anophèle a des capacités d'ajustement fonctionnel aux conditions environnementales stressantes, telles que le déploiement massif des moustiquaires imprégnées d'insecticide longue durée (MILD, ou LLIN pour long-lasting insecticide-treated nets) et la pulvérisation intra domiciliaire de produits à effet rémanent (IRS pour indoor residual spraying) (Sokhna, Ndiath, and Rogier 2013).

Ces mécanismes d'accommodation naturelle sont connus depuis 1956 (Lockwood, Sparks, and Story 1984), mais finalement peu de recherches ont été menées dans ce domaine, car la reproductibilité en modèle de laboratoire demeure délicate (Sokhna, Ndiath, and Rogier 2013). Certaines espèces, comme *An. funestus* et *An. gambiae*, ont ainsi fait évoluer leur comportement

nutritif, développant l'exophagie (Russell et al. 2011; Reddy et al. 2011; Fornadel et al. 2010). Alors que jusqu'ici, elles prenaient plutôt leur repas sanguin sur des sujets humains à l'intérieur des maisons, ces deux espèces ont peu à peu développé des habitudes largement exophages, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se nourrir à l'extérieur des habitations, loin des MILD et de la PID (Russell et al. 2011). Au Bénin, le taux d'exophagie d'*An. funestus* est passé de 45 % à plus de 70 %, après installation des filets anti-moustiques (Corbel et al. 2012).

De façon notable, le phénomène apparaissait réversible chez *An. gambiae*, après l'arrêt des PID dans ce même pays (Ossè et al. 2013). Par ailleurs, au Burkina Faso, les filets imprégnés d'insecticide ont réussi à « forcer » *An. gambiae* à adopter un comportement zoophilique tout à fait inhabituel pour cette espèce normalement anthropophile, ce qui lui a permis de subsister loin de l'Homme (Lefèvre et al. 2009). En Tanzanie, il aura ainsi fallu 12 ans à *An. funestus* pour s'adapter à l'installation de moustiquaires et devenir à la fois exophage et zoophile (Russell et al. 2011).

Au Sénégal dans le village de Dielmo, jusqu'à la mise en place des méthodes de lutte antivectorielle, l'anophèle présentait des pics d'activité de piqûre principalement la nuit, vers une ou deux heures du matin. Aujourd'hui, il semble plutôt les avoir décalés en début de soirée et au petit matin, afin d'éviter le contact avec les insecticides déployés plutôt la nuit pour protéger les populations durant leur sommeil (Trape et al. 2011). Au Bénin, il a été montré que le déploiement massif des MILD induisait tout d'abord un deuxième pic d'activité vers trois ou quatre heures du matin, puis au-delà de trois ans d'usage continu, un décalage de la quasi-totalité des piqûres vers cinq ou six heures (Moiroux et al. 2012). Par exemple, à Lokohoué, trois ans après le déploiement des MILD, 26 % des anophèles arrivaient à piquer après six heures du matin, contre seulement 10 %, auparavant. Ces effets étaient encore plus accentués dans les villages où étaient combinés la PID et l'usage des MILD (Moiroux et al. 2012).

Dans cet exemple, l'adaptation comportementale diurne permettait ainsi aux moustiques de cibler les périodes où les individus ne sont plus protégés, tout particulièrement avant l'aube, lors du début de la journée de travail dans les cultures. Les campagnes de pulvérisation massive de DDT ont incité certaines espèces d'anophèles, comme *An. stephensi*, à déplacer leurs lieux de repos vers des zones qui semblaient justement non traitées. Classiquement, la PID s'opère sur les murs et plafonds des habitations, mais ne peut se faire sur les objets ménagers (Nagpal and Srivastava 2012). Initialement disposé sur toute la hauteur des murs à l'intérieur des habitations, *An. stephensi* a dorénavant tendance à se reposer uniquement sur des surfaces non pulvérisées, échappant ainsi à la rémanence des produits insecticides (Rubert et al. 2016). Au

Moyen-Orient, ce pouvoir d'adaptation a été mis en cause dans l'échec des campagnes antivectorielles fondées sur les méthodes d'IRS, pourtant largement implantées dans certains pays comme le Pakistan (Rubert et al. 2016).

#### **3.4.4 Résistance cuticulaire**

Ce mécanisme de résistance a été démontré principalement chez les ravageurs agricoles (Lin et al. 2012; Koganemaru, Miller, and Adelman 2013), mais relativement négligé chez les moustiques. Cependant, une étude antérieure suggère une association possible entre l'épaisseur de la cuticule et la résistance aux pyréthroides chez *Anopheles funestus* (Wood et al. 2010), tandis qu'une autre étude plus récente a trouvé une pénétration réduite de la deltaméthrine chez les *Anopheles gambiae* résistants (Balabanidou et al. 2016). De plus, une altération de la structure de la cuticule a également été observée parallèlement à la résistance aux insecticides chez *Anopheles arabiensis* (Jones et al. 2013). Des études transcriptomiques montrent une surexpression substantielle de multiples gènes cuticulaires dans plusieurs populations de moustiques *anophèles* et *Aedes* résistants (Vontas et al. 2007; Jones et al. 2013; Balabanidou et al. 2016).

MATERIELS  
ET  
METHODE

## 4 Matériels et méthode

### 4.1 Sites et période d'étude

Les études se sont déroulées dans deux villages du cercle de Kati dans la région de Koulikoro (figure3). Ils sont : Sogolombougou (Commune de Diago) et Ouassorola (Commune de Kalifabougou). Ouassorola est situé à 40km au nord-ouest de Bamako avec une longitude de 8,16W et une latitude de 12,90N. Sogolombougou est à 37 km au nord-ouest de Bamako avec une longitude de 8,14W et une latitude de 12,88N. Le climat est de type soudanien caractérisé par une saison pluvieuse allant de Juin à Octobre, procurant à la ville environ 1200 mm de pluie en année normale. La saison sèche est composée d'une période froide (de Novembre à Février) avec une température moyenne de l'ordre de 20°C et une période chaude (de Mars à Mai) avec en moyenne une température variant de 25° à 30°C.

Solomgobougou (Diago) et Ouassorola (Kalifabougou) sont situés dans la zone soudano-guinéenne. Le climat est de type soudanien, avec des températures très variables au cours de l'année dont les plus basses (18°C) sont observées au mois de janvier et les plus élevées au mois de mai (38°C). La mousson, le vent maritime, et l'harmattan, le vent continental, se succèdent le long de l'année. On y observe une saison pluvieuse (mai à octobre), et une saison sèche divisée en saison sèche fraîche (novembre à janvier) et en saison sèche chaude (février à mai). La végétation est du type de savane herbeuse avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger.

On y rencontre des grands arbres comme le karité (*Vitellariaparadoxa*), le Néré (*Parkiabiglobosa*), le manguier, l'oranger, et des arbustes recouvrant une strate herbacée. La faune est constituée surtout par de petits mammifères notamment les lièvres, les hérissons et quelques phacochères. Les reptiles sont représentés par les margouillats, les scorpions et quelques espèces venimeuses (vipère, cobras, serpent à sonnette etc.). L'étude s'est déroulée de juin à octobre 2021.

## 4.2 Critères de choix des sites

Les villages ont été sélectionnés pour :

- la présence de la faune culicidienne dans les deux sites d'étude (NIARE , 2018 ).
- la bonne collaboration avec les habitants
- la distance acceptable entre eux et Bamako, la capitale du Mali où se trouve le laboratoire principal.

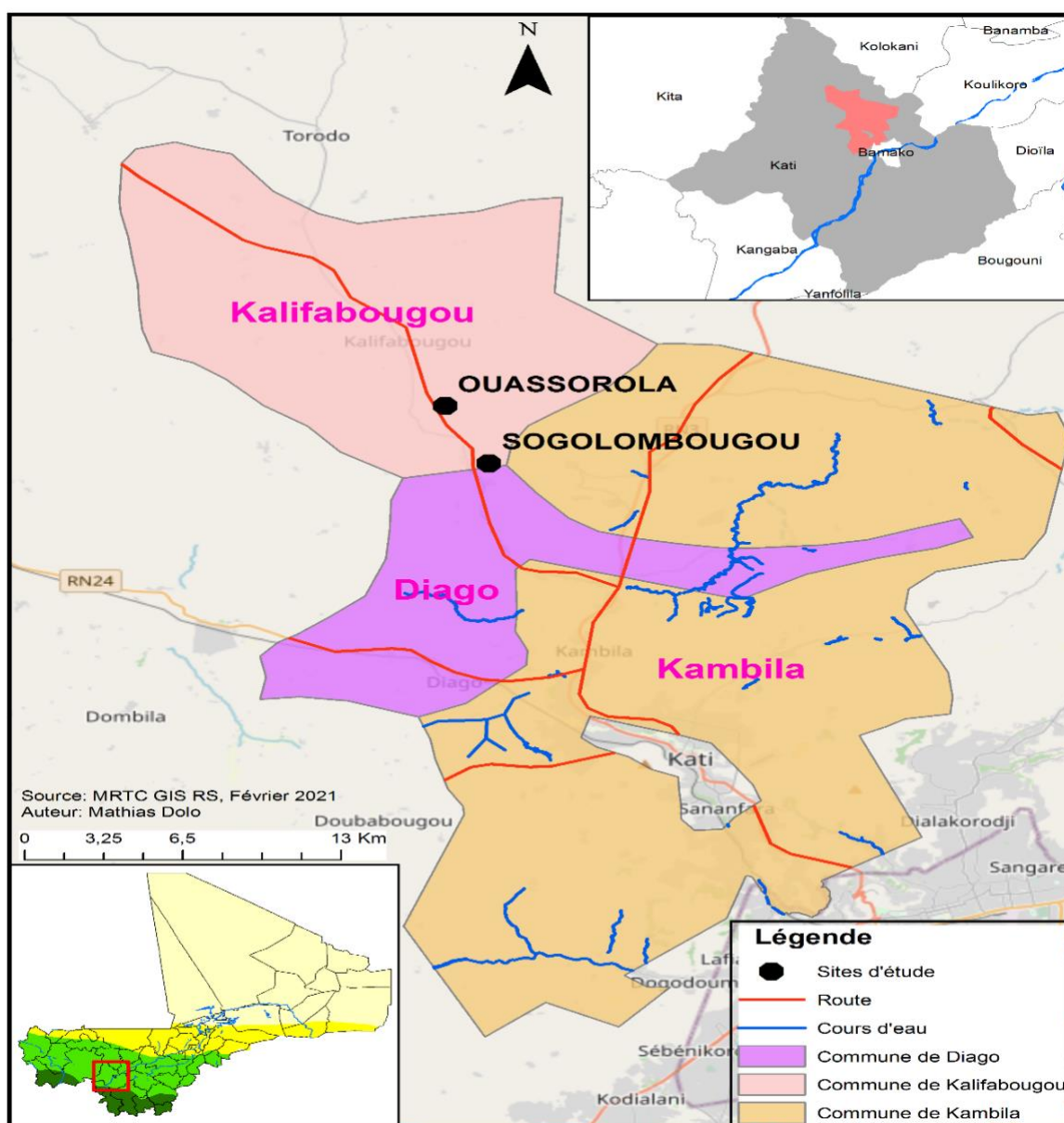


Figure 3: Sites de collecte des moustiques endophiles

### **4.3 Détermination de la sensibilité d'*An. gambiae s.l.* à quatre classes d'insecticides couramment utilisés dans la lutte antivectorielle du paludisme**

Le test biologique OMS de sensibilité est un test exposition-réponse direct, il mesure la mortalité des moustiques lorsque ces insectes sont exposés à une concentration standard connue d'un insecticide donné. Les papiers utilisés pour les tests de sensibilité aux insecticides, et imprégnés de ces produits à la concentration discriminante appropriée, sont fournis avec les kits de test de l'OMS, dont la fabrication est assurée par Université Sains Malaysia et coordonnée par l'OMS (OMS 2018).

#### **4.3.1 Collecte de moustiques endophiles**

Des anophèles femelles ont été collectés dans les chambres d'habitation humaines à l'aide d'aspirateurs de transfert (Figure 4). Dans chaque village, les captures ont été faites dans 90 % des maisons pour avoir un échantillon représentatif. Ces femelles ont été transférées délicatement de façon individuelle dans des gobelets en carton couverts par un tulle moustiquaire (Figure 5) puis dans les cages. Elles étaient gardées dans ces cages, nourries à l'aide du jus sucré (10%) et transportées au laboratoire du MRTC à Bamako.



Figure 4: Collecte de moustiques endophiles à l'aide d'aspirateur de transfert

Les matériels (Figure 5) qui ont été utilisés pour la collecte étaient constitué d'un aspirateur de transfert, d'une torche, des gobelets en carton couverts par un tulle moustiquaire à l'aide d'un élastique, des cages à moustiques et de coton imbibé de jus sucré à 10%.

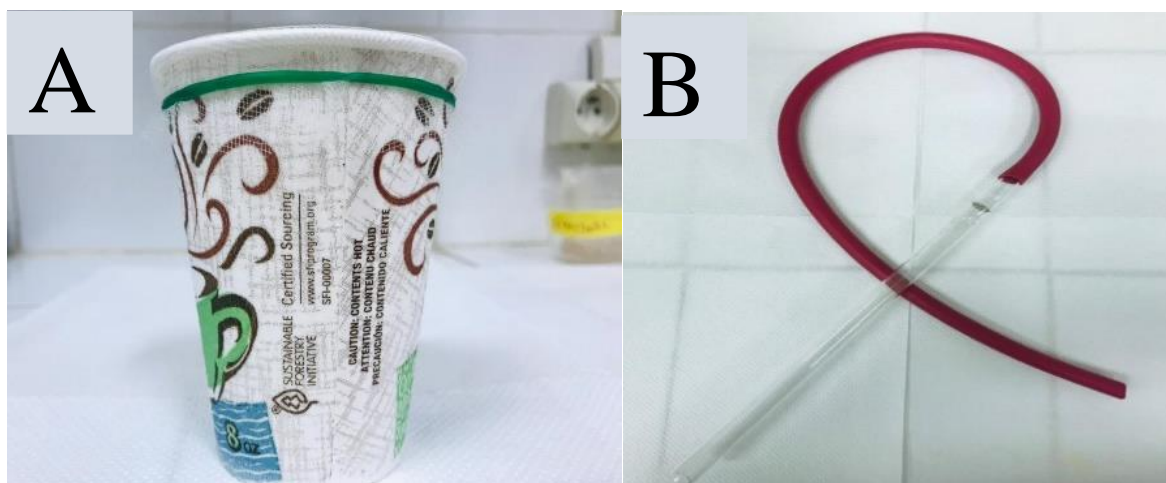


Figure 5: A-Gobelet en carton couverts par un tulle moustiquaire B-Aspirateur de transfert

#### 4.3.2 Elevage des moustiques à l'insectarium du MRTC

Les moustiques adultes collectés et triés sur les sites d'études ont été nourris avec du jus sucré à 10%. Les femelles ont été mises dans les conditions de ponte collective à l'insectarium du



MRTC de Bamako. Les conditions environnementales de l'insectarium étaient à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  pour la température et  $80\pm 10\%$  pour l'humidité relative. Une photo-périodicité de 12 h jour et 12 h nuit était également maintenue. Les femelles de la génération F1 issus de ces adultes collectés sur le terrain ont été utilisées pour les tests insecticides.

#### **4.3.3 Test de sensibilité des moustiques aux insecticides**

Le test biologique OMS de sensibilité est un test exposition-réponse direct (Figure 6 et 7). Il mesure la mortalité des moustiques lorsque ces insectes sont exposés à une concentration standard connue d'un insecticide donné (OMS 2018). Les insecticides utilisés pour cette expérience sont : la deltaméthrine 0,05%, la lambda-cyhalothrine 0,05%, la perméthrine 0,75%, le DDT 4%, le bendiocarbe 0,1% et le fénitrothion 1%. Les femelles F1 adultes de 3 à 5 jours, non gorgées de sang (c'est-à-dire qui ont été nourries au jus sucré et laissées à jeun pendant environ 6 heures) et issues de moustiques femelles capturées dans les chambres d'habitations, ont été utilisées pour réaliser les tests de sensibilité (OMS 2018).

Chaque test de sensibilité aux insecticides a été réalisé sur 20 moustiques en quatre répétitions (tubes portant une pastille rouge) et deux témoins (tubes portant une pastille jaune). Des spécimens de la souche Kisumu ont été exposés aux papiers imprégnés d'insecticide comme mesure d'assurance qualité de l'efficacité des papiers. Le temps d'exposition était de 1 h, ensuite les moustiques ont été déplacés vers les tubes d'observations à pastille verte. Un tampon de coton imbibé d'eau sucrée à 10 % a été mis sur au-dessus des tubes d'observation comportant une toile métallique. 24 heures après l'exposition), les moustiques morts ont été dénombrés et enregistrés. Un moustique est considéré comme vivant s'il est en mesure de voler, indépendamment du nombre de pattes qui lui restent. Un moustique est classé comme mort ou « knocked down » s'il est immobile ou incapable de se lever ou de s'envoler (OMS 2018). Tous les moustiques « knocked down » (assommés ou en état de choc), qu'ils aient ou non perdu des pattes ou des ailes, sont considérés comme moribonds et comptés pour morts (annexe 1).



Figure 6: Transfert des moustiques des cages vers les tubes d'observation (1) puis des tubes d'observation aux tubes d'exposition (2 et 3)



Figure 7: exposition des moustiques aux insecticides

- **Détermination du taux de mortalité**

La mortalité dans l'échantillon testé est calculée en sommant le nombre de moustiques morts dans l'ensemble des tests d'exposition répliqués et en exprimant cette somme sous forme de pourcentage par rapport au nombre total de moustiques exposés :

$$\text{Taux de mortalité observée} = \frac{\text{Nombre total de moustiques morts}}{\text{Effectif total de l'échantillon}} \times 100$$

Il faudra effectuer un calcul similaire pour obtenir une valeur de la mortalité parmi les témoins. Si celle-ci est  $\geq 20$  %, les résultats des tests devront être écartés. Lorsqu'elle est  $< 20$  %, la mortalité observée doit être corrigée à l'aide de la formule d'Abbott de la façon suivante :

$$\text{Taux de mortalité corrigée} = \frac{(\% \text{ mortalité observée} - \% \text{ mortalité chez les témoins})}{(100 - \% \text{ mortalité chez les témoins})} \times 100$$

Si la mortalité chez les témoins est < 5% aucune correction n'est nécessaire sur les résultats de test, tandis que si cette mortalité est  $\geq 5\%$ , une correction s'impose. Lors du rapport des résultats de mortalité, on indiquera toujours la taille de l'échantillon et, de préférence, une estimation de l'intervalle de confiance à 95 % (OMS 2018).

- **Interprétation des résultats**

Les recommandations relatives aux tests avec les concentrations discriminantes sont les suivantes :

Le niveau de résistance a été défini selon les critères donnés par l'OMS (OMS 2018).

- résistant si mortalité < 90%
- résistance probable si mortalité 90 - 97%
- sensible si mortalité  $\geq 98\%$

#### **4.4 Extraction de l'ADN**

Après avoir enregistré la mortalité 24 h après l'exposition, les moustiques encore vivants ont été sacrifiés par congélation et stockés individuellement dans des tubes Eppendorf étiquetés. L'ADN génomique a été extrait du corps entier d'*An. gambiae s.l.* en utilisant le DNAzol (Chomczynski et al. 2018) (annexe 2).

#### **4.5 Identification moléculaire d'*An. gambiae s.l.***

Une analyse moléculaire a été effectuée sur les moustiques anophèles survivants après 24h d'exposition aux insecticides pour déterminer les espèces au sein des deux villages. L'identification moléculaire des espèces a été effectuée en utilisant la technique de PCR décrite par Wilkins, Howell, and Benedict 2006.

#### **4.6 Identification moléculaire de la mutation *kdr L1014F***

L'identification moléculaire de la mutation *kdr L1014F* a été faite par PCR sur les moustiques survivants après 24h d'exposition aux insecticides. Les amorces AgD1 5' ATAGATTCCTCCGACCATG 3', AgD2 5'AGACAAGGATGATGAACC 3', Ag D3 5' AATTTGCATTACTTACGACA 3'et AgD4 5'CTGTAGTGATAGGAAATTTA 3' ont été utilisées pour amplifier les allèles *kdr* de moustiques individuels. Un volume de 2µl de l'ADN total extrait du moustique a été utilisé comme matrice dans une réaction PCR de 15 µl contenant 7,5 µl de HS taq mix red ; 0,5 µM d'amorces AgD4 et AgD3 ; 0,3 µM d'amorces AgD1 et AgD2. Les conditions d'amplification étaient : 94°C pendant 5 min puis trente cycles de 94°C

pendant 25 s, 55°C pendant 20 s et 72°C pendant 8 s avec une extension finale de 10 min à 72°C (Martinez-Torres et al. 1998).

Les fragments amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % et visualisés sous lumière UV. La paire d'amorces Agd1/Agd2 flanque le gène *kdr* en amplifiant un produit de 293 pb comme témoin. La paire d'amorces Agd3/Agd1 ne s'apparie qu'avec la partie résistance du *kdr* gène pour amplifier un fragment de 195pb. Le couple Agd4/Agd2 ne s'associe qu'à la partie du gène sensible en amplifiant un fragment de 137 pb (Martinez-Torres et al. 1998).

#### 4.7 Identification moléculaire de la mutation *ace 1 G119S*

L'identification moléculaire de la mutation *ace 1 G119S* a été faite par PCR sur les moustiques survivants après 24h d'exposition aux insecticides. Les amorces CDCACEF [GGT GGA CGT GTG TGG CTC], CDCACER [CTA CCG TAG CGC AAG GTT C], CDCWT [TGT GGA TCT TCG GCG tCG] et CDCG119SR [CGG TGC CGG AGT AGA AtC T] ont été utilisées pour amplifier les allèles *ace 1* de moustiques individuels, 1µl de l'ADN total extrait du moustique a été utilisé comme matrice dans une réaction PCR de 20 µl contenant 10µl de HS taq mix red ; 6µl de H<sub>2</sub>O et 1µl des amorces CDCACEF, CDCACER, CDCWT et CDCG119SR. Les conditions de PCR étaient à 94°C pendant 5 min puis trente-cinq cycles de 94°C pendant 30 s, 61°C pendant 1 min et 72°C pendant 1min avec une extension finale de 7 min à 72°C.

Les fragments amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % et visualisés sous lumière UV. Les amorces créent une bande universelle de 456 pb, 288 pb pour les individus résistants et 196 pb pour les individus sensibles (MR4 2015; Weill et al. 2004; Wilkins, Howell, and Benedict 2006).

#### 4.8 3.4.4. Détermination des fréquences des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*

La formule suivante a été utilisée pour calculer les fréquences alléliques :

$$f(R) = \frac{2n.RR + n.RS}{2N} \times 100$$

- n est le nombre de moustiques d'un génotype donné
- RR représente le génotype résistant homozygote
- RS représente le génotype hétérozygote
- N le nombre total de moustiques testés

#### **4.9 Analyse des données**

Toutes les données générées ont été saisies dans Microsoft Excel (Office 365) et analysées dans le logiciel Epi Info version 7.

#### **4.10 Considérations éthiques**

Le protocole a été présenté devant le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) de l'Université des Science, des Techniques et des Technologie de Bamako (USTTB) et a été approuvé sous le numéro N°2021-51-CE/USTTB. Le protocole a été expliqué dans chaque village aux autorités traditionnelles (le chef du village et ses conseillers représentant toutes les couches sociales des villages). Les acceptations communautaires ont été documentées sur des fiches d'acceptation communautaire signées par les autorités respectives. Ensuite les propriétaires des chambres retenues pour l'étude ont également donné leurs consentements éclairés et individuels avant le début de l'activité.

# RÉSULTATS

## 5 RESULTATS

### 5.1 Sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides

Au total 960 spécimens d'*An. gambiae s.l.* ont été exposés aux insecticides suivant la procédure de l'OMS . Aucune mortalité n'a été observée chez les témoins ; par conséquent, la formule d'Abbott n'était pas applicable pour corriger les causes naturelles de mortalité dans cette étude. Le contrôle de qualité des papiers imprégnés d'insecticides a été effectué avec la souche de moustique *An. gambiae (Kisumu)* sensible aux pyréthrinoïdes. Les résultats de ces tests ont montré une mortalité de 100% mais ne sont pas présentés dans le document.

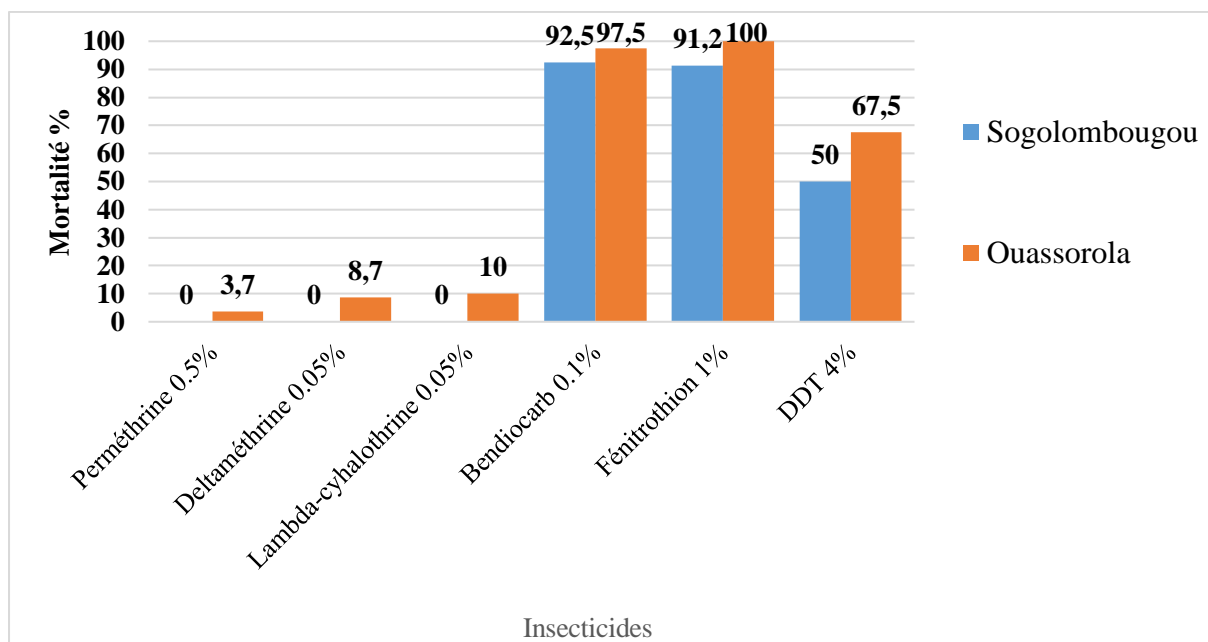


Figure 8: taux de mortalité d'*An. gambiae s.l.* 24 heures après exposition aux différents insecticides dans les deux villages

La figure 8 montre les résultats des tests de sensibilité en fonction de chaque insecticide. Le féntrothion et le bendiocarbe ont été les insecticides les plus efficaces avec une mortalité  $\geq 91,25\%$  dans les deux villages.

**Tableau 2:** taux de mortalité des populations d'*An.gambiae s.l.* à Ouassorola

<b>Insecticides</b>	<b>Testés</b>	<b>Taux de mortalité après 24h (%)</b>	<b>Intervalle de confiance (IC à 95%)</b>	<b>Statut (Phénotype)</b>
<b>Deltaméthrine 0,05%</b>	120	8,7	4,30 – 16,98	Résistant
<b>Perméthrine 0,5%</b>	120	3,7	1,28 – 10,45	Résistant
<b>Lambda-cyhalothrine 0,05%</b>	120	10	5,15 – 18,51	Résistant
<b>DDT 4%</b>	120	67,5	56,64 – 76,76	Résistant
<b>Bendiocarbe 0,1%</b>	120	97,5	91,34 – 99,31	Résistant probable
<b>Fénitrothion 1%</b>	120	100	95,42 – 100	Sensible

La résistance à la perméthrine, à la deltaméthrine, à la lambda-cyhalothrine et au DDT a été confirmée à Ouassorola avec respectivement 3,7% pour la perméthrine, 8,7% pour la deltaméthrine, 10% pour la lambda-cyhalothrine et 67,5% pour le DDT. Les moustiques étaient sensibles au fénitrothion à Ouassorola avec un taux de mortalité de 100%. Une résistance probable au bendiocarbe a été observée au niveau de Ouassorola .

**Tableau 3:** taux de mortalité des populations d'*An. gambiae s.l.* à Sogolombougou

<b>Insecticides</b>	<b>Testés</b>	<b>Taux de mortalité après 24h (%)</b>	<b>Intervalle de confiance (IC à 95%)</b>	<b>Statut (Phénotype)</b>
<b>Deltaméthrine 0,05%</b>	120	0		Résistant
<b>Perméthrine 0,5%</b>	120	0		Résistant
<b>Lambda-cyhalothrine 0,05%</b>	120	0		Résistant
<b>DDT 4%</b>	120	50	39,30 – 60,70	Résistant
<b>Bendiocarbe 0,1%</b>	120	92,5	84,59 – 96,52	Résistant probable
<b>Fénitrothion 1%</b>	120	91,2	83,02 – 95,7	Résistant probable



La résistance à la perméthrine, à la deltaméthrine, à la lambda-cyhalothrine et au DDT a été confirmée au niveau de Sogolombougou avec un taux de mortalité de 0% pour tous les pyréthriinoïdes et 50% pour le DDT. Les moustiques étaient résistants probables au fénitrothion à Sogolombougou avec un taux de 91,2%. Une résistance probable au bendiocarbe a été observée au niveau de Sogolombougou avec un taux de mortalité de 92,5%.

## 5.2 Identification moléculaire d'*An. gambiae s.l.*

Au total 543 spécimens d'*An. gambiae s.l.* ont été identifiés par PCR, la figure 9 montre les proportions des différentes espèces d'*An. gambiae s.l.* identifiées dans les deux villages.

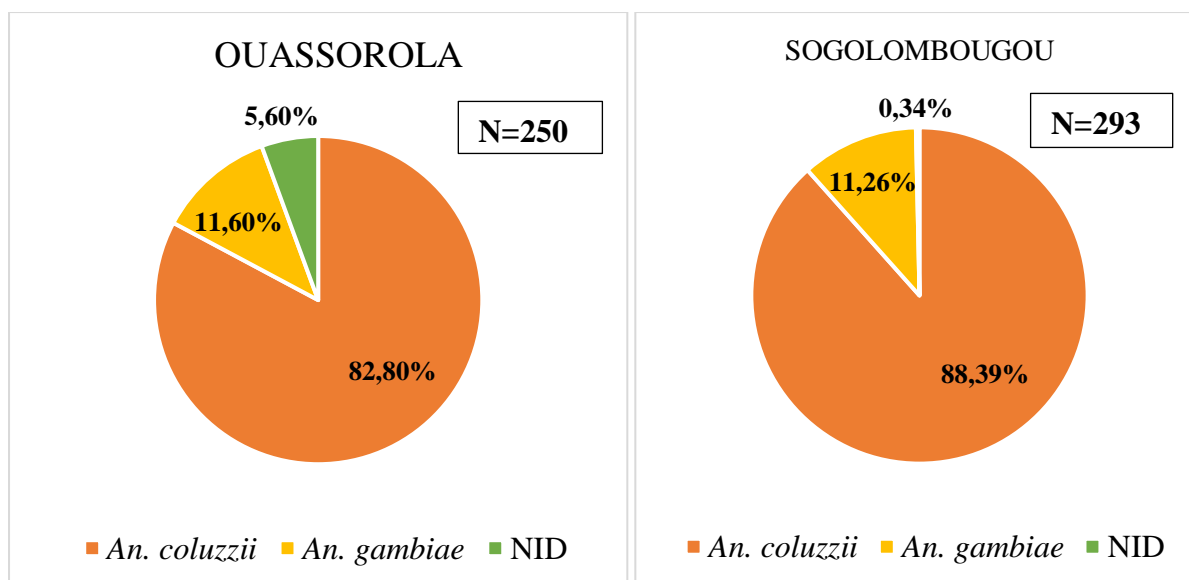


Figure 9: Proportions des différentes espèces d'*An. gambiae s.l.* identifiées dans les deux villages

*An. coluzzii* et *An. gambiae* étaient les deux seuls membres des *An. gambiae s.l.* identifiés dans les deux sites d'études. Dans l'ensemble, il y avait une prédominance d'*An. coluzzii* par rapport à *An. gambiae* dans les deux villages (Figure 9).

### 5.3 Fréquences alléliques des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*

#### 5.3.1. Fréquences alléliques des mutations par village

Au total 543 spécimens d'*An. gambiae s.l.* survivants aux tests d'insecticides ont été analysés. Les tableaux 4 et 5 montrent respectivement la distribution de la fréquence des mutations *kdr L1014F* et *ace-1 G119S* dans les deux sites d'études. Les spécimens non identifiés n'étaient pas pris en compte dans le calcul de la fréquence allélique.

**Tableau 4:** Fréquences alléliques de la mutation *kdr L1014F* dans les deux villages

Localités	Nombre des échantillons analysés	Génotypes				Fréquences <i>kdr L1014F</i> (%)	Intervalle de confiance (IC à 95%)
		RR	RS	SS	NID		
Ouassorola	248	136	81	25	6	<b>72,93</b>	68,81 - 76,70
Sogolombougou	280	185	73	20	2	<b>79,67</b>	76,13 - 82,81

Les fréquences alléliques de la mutation *kdr L1014F* étaient de 72,93% à Ouassorola et 79,67% à Sogolombougou. Le génotype homozygote résistant (RR) a été le plus dominant suivi du génotype RS dans les deux villages.

**Tableau 5:** Fréquences alléliques de la mutation *ace 1 G119S* dans les deux villages

Localités	Nombre des échantillons analysés	Génotypes			Fréquences (%)	Intervalle de confiance (IC à 95%)
		RR	RS	SS		
Ouassorola	2	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>25</b>	4,55 – 69,93
Sogolombougou	13	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>46,15</b>	28,76 – 64,54

Les fréquences alléliques de la mutation *ace 1 G119S* étaient de 25% à Ouassorola et 46,15% à Sogolombougou. Le génotype RR n'a pas été retrouvé à Ouassorola mais à Sogolombougou avec une proportion très faible. Le génotype RS a été retrouvée au niveau des deux sites

d'études. La population d'*An. gambiae s.l.* était sensible au Bendiocarbe et au Fénitrothion ce qui est à l'origine de ce faible nombre des échantillons analysés.

### 5.3.2. Fréquences alléliques des mutations par village et par espèce

Les tableaux 6 et 7 montrent respectivement la variation de la fréquence allélique de la mutation *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* par village et par espèce.

**Tableau 6:** Fréquence allélique de la mutation *kdr L1014F* par village et par espèce

Localités	Nombre des échantillons analysés	<i>An. coluzzii / kdr L1014F</i>				<i>An. gambiae / kdr L1014F</i>			
		Génotypes			Fréquence	Génotypes			Fréquences
		RR	RS	SS		RR	RS	SS	
Ouassorola	231	107	74	22	<b>70,93</b>	24	4	0	<b>92,85</b>
Sogolombougou	277	158	70	19	<b>78,13</b>	27	3	0	<b>95</b>

La mutation *kdr L1014F* a été identifiée chez les deux espèces avec des fréquences alléliques élevées au niveau des deux villages.

**Tableau 7:** Fréquence allélique de la mutation *ace 1 G119S* par village et par espèce

Localités	Nombre des échantillons analysés	<i>An. coluzzii / ace-1 G119S</i>				<i>An. gambiae / ace-1 G119S</i>			
		Génotypes			Fréquence	Génotypes			Fréquences
		RR	RS	SS		RR	RS	SS	
Ouassorola	2	0	0	1	<b>0</b>	0	1	0	<b>50</b>
Sogolombougou	13	1	8	1	<b>50</b>	0	2	1	<b>33</b>

La mutation *ace-1 G119S* a été identifiée dans les deux espèces avec des fréquences alléliques modérées à Sogolombougou, elle a été identifiée seulement chez *An. gambiae* à Ouassorola (Tableau 7).

COMMENTAIRES

ET

DISCUSSION

## 6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

La situation de résistance multiple chez *An. gambiae* retrouvée au Mali avec la présence concomitante des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* est particulièrement inquiétante et constitue une menace majeure en rendant les moustiques insensibles aux insecticides qui sont indispensables pour le succès des stratégies actuelles de lutte contre le paludisme au Mali. (Sovi et al. 2020; Main et al. 2015; Keïta et al. 2020; Keïta et al. 2021; Main et al. 2018; Wragge et al. 2021; Cisse et al. 2015; Keïta et al. 2016). S'il est évident qu'avec les différents usages des insecticides (contrôlés ou non) il est difficile voire impossible d'éviter l'installation de la résistance à tout moment, il est crucial d'accompagner les stratégies de lutte antivectorielle contre le paludisme d'un système efficace de surveillance de la résistance aux insecticides. Cette surveillance permet une détection précoce ainsi qu'une gestion de la résistance basée sur des évidences scientifiques. C'est dans ce cadre que se situe la présente étude dont le but est d'évaluer la sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* à ces classes d'insecticides à savoir les pyréthrinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates qui sont couramment utilisés en santé publique pour la lutte antivectorielle et la fréquence allélique des gènes *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*.

### 6.1 Sensibilité d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides

Dans cette étude, la sensibilité des populations d'*An gambiae s.l.* à quatre classes d'insecticides utilisés en santé publique (deltaméthrine 0,05%, la lambda-cyhalothrine 0,05%, la perméthrine 0,75%, le DDT 4%, le bendiocarbe 0,1% et le fénitrothion 1%) a été étudiée et les deux mécanismes de résistance (mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*) sous-jacents à la résistance phénotypique ont été déterminés dans deux villages du cercle de Kati (Sogolombougou et Ouassorola). Une forte résistance phénotypique d'*An gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes a été retrouvée dans les deux sites d'études, ces résultats sont similaires à ceux de Cisse et al. 2015 qui ont aussi travaillé dans le cercle de Kati.

Cependant une résistance probable aux bendiocarbe et fénitrothion a été identifiée à l'exception du fénitrothion à Ouassorola où la souche était sensible ce qui est contraire aux résultats de Cisse et al. 2015 qui ont trouvé que les souches de Kati étaient sensibles au bendiocarbe et au fénitrothion. Les résultats de cette étude corroborent avec la tendance actuelle de propagation de la résistance aux insecticides chez les principaux vecteurs du paludisme à travers l'Afrique de l'Ouest (Badolo et al. 2012; Amoudji et al. 2019; Ibrahim et al. 2019; Camara et al. 2018; Gueye et al. 2020; Namountougou et al. 2019).

La pression de sélection due à l'utilisation des pyréthrinoïdes à la fois dans la lutte antivectorielle que dans celle contre les ravageurs de cultures serait à la base de cette situation (Chouaïbou et al. 2016; Czeher et al. 2008; Diabate et al. 2002; Fodjo et al. 2018).

## 6.2 Fréquences alléliques des mutations *kdr L1014F* et *ace 1 G119S*

Tout comme plusieurs études récentes menées dans la plupart des pays de l'Afrique de l'Ouest (Gueye et al. 2020; Muhammad et al. 2021; Koukpo et al. 2019; Sagbohan et al. 2021; Amoudji et al. 2019), cette étude a montré une fréquence allélique élevée de la mutation *kdr L1014F* chez les espèces *An. gambiae* et *An. coluzzii* d'*An. gambiae s.l.* dans les deux sites. En outre des études menées par Keïta et al. 2021; Cisse et al. 2015 ont également rapporté la présence de la mutation *kdr L1014F* avec des fréquences élevées chez *An gambiae s.l.* au Mali.

La mutation *ace 1 G119S* a été identifiée au niveau de Ouassorola et Sogolombougou avec des fréquences modérées comparables à l'étude menée par Keïta et al. 2020 à Koula, Dangassa et Karadié, contrairement à celle de Cisse et al. 2015 qui a retrouvé la mutation *ace 1 G119S* avec des fréquences plus faibles à Bla, Kita, Bougouni et Cardio. Le génotype hétérozygote RS a été le plus identifié au niveau des deux villages par contre le génotype homozygote RR n'a pas été identifié à Ouassorola mais à Sogolombougou avec des proportions faibles, ces résultats sont similaires à ceux de Keïta et al. 2020; Cisse et al. 2015. Ces résultats pourraient s'expliquer par une mortalité considérable des individus résistants homozygotes pendant la nymphose par rapport à leurs homologues sensibles (Djogbénu et al. 2010).

Parmi les moustiques résistants (phénotype) 8,5% des moustiques génotypés pour la mutation *kdr L1014F* avaient le génotype SS (sensible) et 20% de ceux génotypés pour la mutation *ace 1* avaient aussi le génotype SS (sensible), l'origine de cette résistance pourrait être due à la résistance métabolique ou à la mutation *kdr L1014S*, les tests de synergie et le génotypage de la mutation *kdr L1014S* pourraient apporter les éléments de réponse pour expliquer le génotype SS (sensible) de ces moustiques. Les 1,5 % de moustiques non identifiés pourraient être dues à un problème d'extraction d'ADN.

## 6.3 Composition de la population vectrice

Les résultats obtenus ont montré que les espèces vectrices rencontrées étaient *An. coluzzii* et *An. gambiae* avec une prédominance d'*An. coluzzii* au niveau des deux villages, ce qui est similaire aux résultats de Cisse et al. 2015 qui ont eu une dominance de *An. coluzzii* dans la région de Kati cependant *An. gambiae* n'était pas retrouvées durant leur étude. La

prédominance d'*An. coluzzii* a été également observée par NIARE . 2018 au niveau des deux villages.

#### **6.4. Implication des résistances détectées dans la lutte antivectorielle au Mali**

La présence de la résistance aux insecticides concomitamment avec la mutation *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* chez *An. gambiae* et *An. coluzzii* représentent un obstacle au succès futur des programmes de lutte contre le paludisme basés sur les MILD ou les PID. Ce qui représente une perte d'énergie, de temps et surtout de l'argent puisque les insecticides utilisés pour la lutte antivectorielle ne seront pas efficaces contre les anophèles. L'étude souligne l'importance de développer en urgence de nouvelles stratégies alternatives pour le contrôle des principaux vecteurs du paludisme au Mali. Il est judicieux que le programme national entame des discussions entre les parties prenantes à l'échelle nationale pour déterminer si les ressources sont suffisantes et peuvent être immédiatement mobilisées pour une utilisation alternée des insecticides au niveau des sites d'études et aussi de continuer à suivre l'évolution de la résistance.

#### **6.5 Limites de l'étude**

Certains moustiques résistants (phénotype) génotypés pour la mutation *kdr L1014F* avaient le génotype SS (sensible) et ceux génotypés pour la mutation *ace 1* avaient aussi le génotype SS (sensible), l'origine de cette résistance pourrait être due à la résistance métabolique ou à la mutation *kdr L1014S*. Nous n'avons pas réalisé les tests de synergie et le génotypage de la mutation *kdr L1014S* pour apporter des éléments de réponse permettant d'expliquer le génotype SS (sensible) de ces moustiques qui avaient le statut résistant suite au test de sensibilité.

CONCLUSION  
ET  
RECOMMENDATIONS



## 7 CONCLUSION

Il ressort de cette étude une forte résistance de *An. coluzzii* et *An. gambiae* à la deltaméthrine 0,05%, à la lambda-cyhalothrine 0,05%, à la perméthrine 0,75%, au DDT 4% et au bendiocarbe 0,1% . *An. gambiae s.l* était sensible au fénitrothion 1% à Ouassorola. Il a été observé une fréquence élevée des mutations *kdr L1014F* et *Ace-1 G119S* dans les deux villages.

Les espèces du complexe *An. gambiae s.l.* retrouvées étaient *An. gambiae* et *An. coluzzii*.

Le génotype RR pour la mutation *kdr L1014F* a été le plus dominant suivi du génotype RS dans les deux sites.

## 8 RECOMMANDATIONS

A la lumière des résultats de cette étude les recommandations suivantes ont été formulées :

Au PNLP de :

- Renforcer Le suivi de la résistance au niveau des sites d'études pour mettre à jour la base des informations pour un déploiement rationnel des outils existants pour une lutte antivectorielle efficace contre le paludisme au Mali

Aux chercheurs

- Développer de nouveaux outils de lutte contre les moustiques

REFERENCE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## 9 REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Amoudji, Adjovi D., Koffi M. Ahadji-Dabla, Aristide Sawdetuo Hien, Yawo Georges Apétogbo, Bienvenu Yaméogo, Diloma Dieudonné Soma, Rabila Bamogo, Rachid Tinah Atcha-Oubou, Roch Kounbobr Dabiré, and Guillaume Koffivi Ketoh. 2019. "Insecticide Resistance Profiles of *Anopheles Gambiae* s.l. in Togo and Genetic Mechanisms Involved, during 3-Year Survey: Is There Any Need for Resistance Management?" *Malaria Journal* 18 (1). BioMed Central: 177. doi:10.1186/S12936-019-2813-Z.
- Badolo, Athanase, Alphonse Traore, Christopher M. Jones, Antoine Sanou, Lori Flood, Wamdaogo M. Guelbeogo, Hilary Ranson, and Nfale Sagnon. 2012. "Three Years of Insecticide Resistance Monitoring in *Anopheles Gambiae* in Burkina Faso: Resistance on the Rise?" *Malaria Journal* 11. BioMed Central: 232. doi:10.1186/1475-2875-11-232.
- Balabanidou, Vasileia, Anastasia Kampouraki, Marina Maclean, Gary J. Blomquist, Claus Tittiger, M. Patricia Juárez, Sergio J. Mijailovsky, et al. 2016. "Cytochrome P450 Associated with Insecticide Resistance Catalyzes Cuticular Hydrocarbon Production in *Anopheles Gambiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (33). National Academy of Sciences: 9268–73. doi:10.1073/PNAS.1608295113/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Camara, Soromane, Alphonsine A. Koffi, Ludovic P. Ahoua Alou, Kouakou Koffi, Jean Paul K. Kabran, Aboubacar Koné, Mathieu F. Koffi, Raphaël N'Guessan, and Cédric Penetier. 2018. "Mapping Insecticide Resistance in *Anopheles Gambiae* (s.l.) from Côte d'Ivoire." *Parasites & Vectors* 11 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-017-2546-1.
- Carnevale, Pierre; Robert, Vincent. 2017. "Carnevale: Les Anophèles: Biologie, Transmission... - Google Scholar." [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Les+anophèles+-+biologie,+transmission+du+Plasmodium+et+lutte+antivectorielle&author=P+Carnevale&author=V+Robert&author=S+Manguin&author=V+Corbel&author=D+Fontenille&publication\\_year=2009&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Les+anophèles+-+biologie,+transmission+du+Plasmodium+et+lutte+antivectorielle&author=P+Carnevale&author=V+Robert&author=S+Manguin&author=V+Corbel&author=D+Fontenille&publication_year=2009&).
- Carnevale, Pierre, and Vincent Robert. 2009. "Les Anophèles : Biologie, Transmission Du Plasmodium et Lutte Antivectorielle."
- Chomczynski, Piotr, Karol Mackey, Roman Drews, and William Wilfinger. 2018. "DNAzol®: A Reagent for the Rapid Isolation of Genomic DNA." <https://doi.org/10.2144/97223pf01> 22 (3). Future Science Ltd London, UK : 550–53. doi:10.2144/97223PF01.
- Chouaïbou, Mouhamadou S., Behi K. Fodjo, Gilbert Fokou, Ouattara F. Allassane, Benjamin G. Koudou, Jean Philippe David, Christophe Antonio-Nkondjio, Hilary Ranson, and Bassirou Bonfoh. 2016. "Influence of the Agrochemicals Used for Rice and Vegetable Cultivation on Insecticide Resistance in Malaria Vectors in Southern Côte d'Ivoire." *Malaria Journal* 15 (1). BioMed Central: 426. doi:10.1186/S12936-016-1481-5.
- Chukwuekezie, Okechukwu, Emmanuel Nwosu, Udoka Nwangwu, Festus Dogunro, Cosmas Onwude, Nneka Agashi, Ebuka Ezihe, et al. 2020. "Resistance Status of *Anopheles Gambiae* (s.l.) to Four Commonly Used Insecticides for Malaria Vector Control in South-East Nigeria." *Parasites & Vectors* 13 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-020-04027-Z.
- Cisse, Moussa B.M., Chitan Keita, Abdourhamane Dicko, Dereje Dengela, Jane Coleman,

- Bradford Lucas, Jules Mihigo, et al. 2015. "Characterizing the Insecticide Resistance of *Anopheles Gambiae* in Mali." *Malaria Journal* 14 (1). BioMed Central: 327. doi:10.1186/S12936-015-0847-4.
- Coetzee, Maureen, Richard H. Hunt, Richard Wilkerson, Alessandra Della Torre, Mamadou B. Coulibaly, and Nora J. Besansky. 2013. "Anopheles Coluzzii and Anopheles Amharicus, New Members of the Anopheles Gambiae Complex." *Zootaxa* 3619 (3): 246–274–246–274. doi:10.11646/ZOOTAXA.3619.3.2.
- Corbel, Vincent, Martin Akogbeto, Georgia B. Damien, Armel Djenontin, Fabrice Chandre, Christophe Rogier, Nicolas Moiroux, et al. 2012. "Combination of Malaria Vector Control Interventions in Pyrethroid Resistance Area in Benin: A Cluster Randomised Controlled Trial." *The Lancet Infectious Diseases* 12 (8). Elsevier: 617–26. doi:10.1016/S1473-3099(12)70081-6.
- Czeher, Cyrille, Rabiou Labbo, Ibrahim Arzika, and Jean Bernard Duchemin. 2008. "Evidence of Increasing Leu-Phe Knockdown Resistance Mutation in *Anopheles Gambiae* from Niger Following a Nationwide Long-Lasting Insecticide-Treated Nets Implementation." *Malaria Journal* 7. BioMed Central: 189. doi:10.1186/1475-2875-7-189.
- Diabate, Abdoulaye, Thierry Baldet, Fabrice Chandre, Martin Akogbeto, T. Robert Guiguemde, Frédéric Darriet, Cécile Brengues, et al. 2002. "The Role of Agricultural Use of Insecticides in Resistance to Pyrethroids in *Anopheles Gambiae* s.l. in Burkina Faso." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67 (6). Oxford University Press: 617–22. doi:10.4269/AJTMH.2002.67.617.
- Diouf, El hadji, El hadji Amadou Niang, Badara Samb, Cheikh Tidiane Diagne, Mbaye Diouf, Abdoulaye Konaté, Ibrahima Dia, Ousmane Faye, and Lassana Konaté. 2020. "Multiple Insecticide Resistance Target Sites in Adult Field Strains of *An.Gambiae* (s.l.) from Southeastern Senegal." *Parasites & Vectors* 13 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-020-04437-Z.
- Djogbéno, Luc, Valérie Noel, and Philip Agnew. 2010. "Costs of Insensitive Acetylcholinesterase Insecticide Resistance for the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* Homozygous for the G119S Mutation." *Malaria Journal* 9 (1). BioMed Central: 12. doi:10.1186/1475-2875-9-12.
- Du, W., T. S. Awolola, P. Howell, L. L. Koekemoer, B. D. Brooke, M. Q. Benedict, M. Coetzee, and L. Zheng. 2005. "Independent Mutations in the Rdl Locus Confer Dieldrin Resistance to *Anopheles Gambiae* and *An. Arabiensis*." *Insect Molecular Biology* 14 (2). John Wiley & Sons, Ltd: 179–83. doi:10.1111/J.1365-2583.2005.00544.X.
- Fodjo, Behi K., Benjamin G. Koudou, Emmanuel Tia, Jasmina Saric, Prisca B. N'Dri, Marius G. Zoh, Christabelle S. Gba, Alida Kropf, Nestor B. Kesse, and Mouhamadou S. Chouaïbou. 2018. "Insecticides Resistance Status of *An. Gambiae* in Areas of Varying Agrochemical Use in Côte D'Ivoire." *BioMed Research International* 2018. Hindawi Limited. doi:10.1155/2018/2874160.
- Fornadel, Christen M., Laura C. Norris, Gregory E. Glass, and Douglas E. Norris. 2010. "Analysis of *Anopheles Arabiensis* Blood Feeding Behavior in Southern Zambia during the Two Years after Introduction of Insecticide-Treated Bed Nets." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (4). The American Society of Tropical Medicine and Hygiene: 848. doi:10.4269/AJTMH.2010.10-0242.

- Giles, George Michael James. 1902. "A Handbook of the Gnats or Mosquitoes Giving the Anatomy and Life History of the Culicid";" *A Handbook of the Gnats or Mosquitoes Giving the Anatomy and Life History of the Culicidæ*, April. John Bale, Sons & Danielsson, Ltd. 83, 85, 87 & 89, Great Titchfield Street, Oxford Street, W. doi:10.5962/BHL.TITLE.101828.
- Gueye, Oumou K., Magellan Tchouakui, Abdoulaye K. Dia, Mouhamed B. Faye, Amblat A. Ahmed, Murielle J. Wondji, Daniel N. Nguiffo, et al. 2020. "Insecticide Resistance Profiling of *Anopheles Coluzzii* and *Anopheles Gambiae* Populations in the Southern Senegal: Role of Target Sites and Metabolic Resistance Mechanisms." *Genes* 11 (12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI): 1–17. doi:10.3390/GENES11121403.
- Haubruge, Éric, and Marcel Amichot. 1998. "Les Mécanismes Responsables de La Résistance Aux Insecticides Chez Les Insectes et Les Acariens | Université de Liège." [https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?file=1&id=17583&pid=15861#:~:text=Le m\u00e9canisme de r\u00e9sistance comportemental,une r\u00e9pulsion \(qui permet \u00e0](https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?file=1&id=17583&pid=15861#:~:text=Le m\u00e9canisme de r\u00e9sistance comportemental,une r\u00e9pulsion (qui permet \u00e0)
- Hemming-Schroeder, Elizabeth, Stephanie Strahl, Eugene Yang, Amanda Nguyen, Eugenia Lo, Daibin Zhong, Harrysone Atieli, Andrew Githeko, and Guiyun Yan. 2018. "Emerging Pyrethroid Resistance among *Anopheles Arabiensis* in Kenya." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (3). The American Society of Tropical Medicine and Hygiene: 704. doi:10.4269/AJTMH.17-0445.
- Ibrahim, Sulaiman S., Muhammad M. Mukhtar, Helen Irving, Rabiou Labbo, Michael O. Kusimo, Izamn\u00e9 Mahamadou, and Charles S. Wondji. 2019. "High Plasmodium Infection and Multiple Insecticide Resistance in a Major Malaria Vector *Anopheles Coluzzii* from Sahel of Niger Republic." *Malaria Journal* 18 (1). BioMed Central: 181. doi:10.1186/S12936-019-2812-0.
- Jones, Christopher M., Khamis A. Haji, Bakari O. Khatib, Judit Bagi, Juma McHa, Gregor J. Devine, Matthew Daley, et al. 2013. "The Dynamics of Pyrethroid Resistance in *Anopheles Arabiensis* from Zanzibar and an Assessment of the Underlying Genetic Basis." *Parasites & Vectors* 6 (1). BioMed Central: 343. doi:10.1186/1756-3305-6-343.
- Jones, Christopher M., Milindu Liyanapathirana, Fiacre R. Agossa, David Weetman, Hilary Ranson, Martin James Donnelly, and Craig S. Wilding. 2012. "Footprints of Positive Selection Associated with a Mutation (N1575Y) in the Voltage-Gated Sodium Channel of *Anopheles Gambiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17). National Academy of Sciences: 6614–19. doi:10.1073/PNAS.1201475109/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Ke\u00efta, M., S. Traor\u00e9, N. Sogoba, A. M. Dicko, B. Coulibaly, A. Sacko, S. Doumbia, and S. F. Traor\u00e9. 2016. "[Susceptibility Status of *Anopheles Gambiae* Sensu Lato to Insecticides Commonly Used for Malaria Control in Mali]." *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique (1990)* 109 (1). Bull Soc Pathol Exot: 39–45. doi:10.1007/S13149-015-0461-2.
- Ke\u00efta, Moussa, Sidy Doumbia, Ibrahim Sissoko, Mahamoudou Tour\u00e9, Sory Ibrahim Diawara, Drissa Konat\u00e9, Ambi\u00e9l\u00e8 Bernard Sodio, et al. 2021. "Indoor and Outdoor Malaria Transmission in Two Ecological Settings in Rural Mali: Implications for Vector Control." *Malaria Journal* 20 (1). BioMed Central: 127. doi:10.1186/S12936-021-03650-0.
- Ke\u00efta, Moussa, Fousseyni Kan\u00e9, Oumar Thiero, Boiss\u00e9 Traor\u00e9, Francis Zeukeng, Ambi\u00e9l\u00e8

- Bernard Sodio, Sekou Fantamady Traoré, Rousseau Djouaka, Seydou Doumbia, and Nafomon Sogoba. 2020. "Acetylcholinesterase (Ace-1R) Target Site Mutation G119S and Resistance to Carbamates in *Anopheles Gambiae* (Sensu Lato) Populations from Mali." *Parasites & Vectors* 13 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-020-04150-X.
- Keïta, Moussa, Nafomon Sogoba, Fousseyni Kané, Boissé Traoré, Francis Zeukeng, Boubacar Coulibaly, Ambiélé Bernard Sodio, Sekou Fantamady Traoré, Rousseau Djouaka, and Seydou Doumbia. 2021. "Multiple Resistance Mechanisms to Pyrethroids Insecticides in *Anopheles Gambiae* Sensu Lato Population From Mali, West Africa." *The Journal of Infectious Diseases* 223 (Suppl 2). Oxford University Press: S81. doi:10.1093/INFDIS/JIAA190.
- Koganemaru, Reina, Dini M. Miller, and Zach N. Adelman. 2013. "Robust Cuticular Penetration Resistance in the Common Bed Bug (*Cimex Lectularius* L.) Correlates with Increased Steady-State Transcript Levels of CPR-Type Cuticle Protein Genes." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106 (3). Academic Press: 190–97. doi:10.1016/J.PESTBP.2013.01.001.
- Koukpo, Come Z., Arsène Jacques Y.H. Fassinou, Razaki A. Ossè, Fiacre R. Agossa, Arthur Sovi, Wilfrid T. Sewadé, Sidick Aboubakar, Benoît S. Assogba, Martin C. Akogbeto, and Michel Sezonlin. 2019. "The Current Distribution and Characterization of the L1014F Resistance Allele of the Kdr Gene in Three Malaria Vectors (*Anopheles Gambiae*, *Anopheles Coluzzii*, *Anopheles Arabiensis*) in Benin (West Africa)." *Malaria Journal* 18 (1). BioMed Central: 175. doi:10.1186/S12936-019-2808-9.
- Lefèvre, Thierry, Louis Clément Gouagna, Kounbrobr Roch Dabire, Eric Elguero, Didier Fontenille, Carlo Costantini, and Frédéric Thomas. 2009. "Evolutionary Lability of Odour-Mediated Host Preference by the Malaria Vector *Anopheles Gambiae*." *Tropical Medicine & International Health : TM & IH* 14 (2). Trop Med Int Health: 228–36. doi:10.1111/J.1365-3156.2009.02206.X.
- Lin, Yuying, Tao Jin, Ling Zeng, and Yongyue Lu. 2012. "Cuticular Penetration of  $\beta$ -Cypermethrin in Insecticide-Susceptible and Resistant Strains of *Bactrocera Dorsalis*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103 (3). Academic Press: 189–93. doi:10.1016/J.PESTBP.2012.05.002.
- Lockwood, Jeffrey A., Thomas C. Sparks, and Richard N. Story. 1984. "Evolution of Insect Resistance to Insecticides: A Reevaluation of the Roles of Physiology and Behavior." *Bulletin of the Entomological Society of America* 30 (4). Oxford Academic: 41–51. doi:10.1093/BESA/30.4.41.
- Main, Bradley J., Amanda Everitt, Anthony J. Cornel, Fereydoun Hormozdiari, and Gregory C. Lanzaro. 2018. "Genetic Variation Associated with Increased Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito, *Anopheles Coluzzii*." *Parasites & Vectors* 11 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-018-2817-5.
- Main, Bradley J., Yoosook Lee, Travis C. Collier, Laura C. Norris, Katherine Brisco, Abdrahamane Fofana, Anthony J. Cornel, and Gregory C. Lanzaro. 2015. "Complex Genome Evolution in *Anopheles Coluzzii* Associated with Increased Insecticide Usage in Mali." *Molecular Ecology* 24 (20). Wiley-Blackwell: 5145. doi:10.1111/MEC.13382.
- Martinez-Torres, D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Bergé, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, and D. Pauron. 1998. "Molecular Characterization of Pyrethroid Knockdown Resistance (Kdr) in the Major Malaria Vector *Anopheles Gambiae* s.S."

*Insect Molecular Biology* 7 (2). John Wiley & Sons, Ltd: 179–84. doi:10.1046/J.1365-2583.1998.72062.X.

- Mint Mohamed Lemine, Aichetou, Mohamed Aly Ould Lemrabott, El Hadji Amadou Niang, Leonardo K. Basco, Hervé Bogreau, Ousmane Faye, and Ali Ould Mohamed Salem Boukhary. 2018. “Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Arabiensis* in Nouakchott, Mauritania.” *Parasites & Vectors* 11 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-018-2923-4.
- Moiroux, Nicolas, Marinely B. Gomez, Cédric Pennetier, Emmanuel Elanga, Armel Djènontin, Fabrice Chandre, Innocent Djègbé, Hélène Guis, and Vincent Corbel. 2012. “Changes in *Anopheles Funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin.” *The Journal of Infectious Diseases* 206 (10). J Infect Dis: 1622–29. doi:10.1093/INFDIS/JIS565.
- MR4. 2015. “Methods in *Anopheles* Research Manual.” <https://www.beiresources.org/AnophelesProgram/TrainingMethods.aspx>.
- Muhammad, Abdullahi, Sulaiman S. Ibrahim, Muhammad M. Mukhtar, Helen Irving, Maduamaka C. Abajue, Noutcha M.A. Edith, Sabitu S. Dau, Mark J.I. Paine, and Charles S. Wondji. 2021. “High Pyrethroid/DDT Resistance in Major Malaria Vector *Anopheles Coluzzii* from Niger-Delta of Nigeria Is Probably Driven by Metabolic Resistance Mechanisms.” *PLoS ONE* 16 (3). Public Library of Science. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0247944.
- Nagpal, BN, and Aruna Srivastava. 2012. “Resting Behaviour of *Anopheles Stephensi* Type Form to Assess Its Amenability to Control Malaria through Indoor Residual Spray - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23135013/>.
- Namountougou, Moussa, Dieudonné Diloma Soma, Mahamadi Kientega, Mahamoudou Balboné, Didier P. Alexandre Kaboré, Samuel Fogné Drabo, Ahmed Y. Coulibaly, et al. 2019. “Insecticide Resistance Mechanisms in *Anopheles Gambiae* Complex Populations from Burkina Faso, West Africa.” *Acta Tropica* 197 (September). Elsevier: 105054. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2019.105054.
- NIARE, Daouda. 2018. “Caractérisation Des Vecteurs Du Paludisme En Prélude à La Lutte Génétique Dans Quatre Villages Du Cercle de Kati, Région de Koulikoro, Mali.”
- OMS. 2014. “Entomologie Du Paludisme et Lutte Antivectorielle. Guide Du Participant.”
- . 2018. *Procédures Pour Tester La Résistance Aux Insecticides Chez Les Moustiques Vecteurs Du Paludisme. Seconde Édition Procédures Pour Tester La Résistance Aux Insecticides Chez Les Moustiques Vecteurs Du Paludisme Programme Mondial de Lutte Antipaludique*. Edited by OMS.
- . 2019. “Lignes Directrices Pour La Lutte Contre Les Vecteurs Du Paludisme,” 115. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/328164/9789242550498-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- . 2021a. “A World Malaria Report 2021.” <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>.
- . 2021b. “Lignes Directrices de l’OMS Sur Le Paludisme, 16 Février 2021.” <https://apps.who.int/iris/handle/10665/344167?irgwc=1&clickid=Sv63oSTvfyIULdz3f1IRXomUkD08O2LwQsdQ80>.

- Ossè, Razaki A., Rock Aïkpon, Ghélus Louis Gbédjissi, Virgile Gnanguenon, Michel Sèzonlin, Renaud Govoétchan, Arthur Sovi, Olivier Oussou, Frédéric Oké-Agbo, and Martin Akogbéto. 2013. "A Shift from Indoor Residual Spraying (IRS) with Bendiocarb to Long-Lasting Insecticidal (Mosquito) Nets (LLINs) Associated with Changes in Malaria Transmission Indicators in Pyrethroid Resistance Areas in Benin." *Parasites & Vectors* 6 (1). BioMed Central: 73. doi:10.1186/1756-3305-6-73.
- Pwalia, Rebecca, Joannitta Joannides, Alidu Iddrisu, Charlotte Addae, Dominic Acquah-Baidoo, Dorothy Obuobi, Godwin Amlalo, et al. 2019. "High Insecticide Resistance Intensity of *Anopheles Gambiae* (s.l.) and Low Efficacy of Pyrethroid LLINs in Accra, Ghana." *Parasites & Vectors* 12 (1). Parasit Vectors. doi:10.1186/S13071-019-3556-Y.
- Reddy, Michael R., Hans J. Overgaard, Simon Abaga, Vamsi P. Reddy, Adalgisa Caccone, Anthony E. Kiszewski, and Michel A. Slotman. 2011. "Outdoor Host Seeking Behaviour of *Anopheles Gambiae* Mosquitoes Following Initiation of Malaria Vector Control on Bioko Island, Equatorial Guinea." *Malaria Journal* 10. BioMed Central: 184. doi:10.1186/1475-2875-10-184.
- Rubert, A., L. Guillon-Grammatico, J. Chandenier, I. Dimier-Poisson, and G. Desoubeaux. 2016. "Insecticide Resistance in *Anopheles* Mosquitoes : Additional Obstacles in the Battle against Malaria." *Medecine et Sante Tropicales* 26 (4). Med Sante Trop: 423–31. doi:10.1684/MST.2016.0634.
- Russell, Tanya L., Nicodem J. Govella, Salum Azizi, Christopher J. Drakeley, S. Patrick Kachur, and Gerry F. Killeen. 2011. "Increased Proportions of Outdoor Feeding among Residual Malaria Vector Populations Following Increased Use of Insecticide-Treated Nets in Rural Tanzania." *Malaria Journal* 10. BioMed Central: 80. doi:10.1186/1475-2875-10-80.
- Sagbohan, Hermann Watson, Casimir D. Kpanou, Razaki Osse, Fortuné Dagnon, Germain G. Padonou, André Aimé Sominahouin, Albert Sourou Salako, et al. 2021. "Intensity and Mechanisms of Deltamethrin and Permethrin Resistance in *Anopheles Gambiae* s.l. Populations in Southern Benin." *Parasites & Vectors* 14 (1). BioMed Central: 202. doi:10.1186/S13071-021-04699-1.
- Silva, Ana Paula B, Joselita Maria M Santos, and Ademir J Martins. 2014. "Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Anophelines and Their Association with Resistance to Pyrethroids – a Review." *Parasites & Vectors* 7 (1). BioMed Central. doi:10.1186/1756-3305-7-450.
- Sogoba, Nafomon, Penelope Vounatsou, Magaran M. Bagayoko, Seydou Doumbia, Guimogo Dolo, Laura Gosoniu, Sékou F. Traoré, Thomas A. Smith, and Yéya T. Touré. 2008. "Spatial Distribution of the Chromosomal Forms of *Anopheles Gambiae* in Mali." *Malaria Journal* 7. BioMed Central: 205. doi:10.1186/1475-2875-7-205.
- Sokhna, C., M. O. Ndiath, and C. Rogier. 2013. "The Changes in Mosquito Vector Behaviour and the Emerging Resistance to Insecticides Will Challenge the Decline of Malaria." *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19 (10). Clin Microbiol Infect: 902–7. doi:10.1111/1469-0691.12314.
- Soumaila, H., M. Idrissa, M. Akgobeto, G. Habi, H. Jackou, I. Sabiti, A. Abdoulaye, A. Daouda, I. Souleymane, and R. Osse. 2017. "Multiple Mechanisms of Resistance to Pyrethroids in *Anopheles Gambiae* s.l Populations in Niger." *Medecine et Maladies*



- Infectieuses* 47 (6). *Med Mal Infect*: 415–23. doi:10.1016/J.MEDMAL.2017.04.012.
- Sovi, Arthur, Chitan Keita, Youssouf Sinaba, Abdourhamane Dicko, Ibrahim Traore, Moussa B.M. Cisse, Ousmane Koita, et al. 2020. “Anopheles Gambiae (s.l.) Exhibit High Intensity Pyrethroid Resistance throughout Southern and Central Mali (2016–2018): PBO or next Generation LLINs May Provide Greater Control.” *Parasites & Vectors* 13 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-020-04100-7.
- Stica, Caleb, Claire L. Jeffries, Seth R. Irish, Yaya Barry, Denka Camara, Ismael Yansane, Mojca Kristan, Thomas Walker, and Louisa A. Messenger. 2019. “Characterizing the Molecular and Metabolic Mechanisms of Insecticide Resistance in Anopheles Gambiae in Faranah, Guinea.” *Malaria Journal* 18 (1). BioMed Central: 244. doi:10.1186/S12936-019-2875-Y.
- Tandina, Fatalmoudou, Ogobara Doumbo, Alpha Seydou Yaro, Sékou F. Traoré, Philippe Parola, and Vincent Robert. 2018. “Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Diseases in Mali, West Africa.” *Parasites & Vectors* 11 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S13071-018-3045-8.
- Trape, Jean François, Adama Tall, Nafissatou Diagne, Ousmane Ndiath, Alioune B. Ly, Joseph Faye, Fambaye Dieye-Ba, et al. 2011. “Malaria Morbidity and Pyrethroid Resistance after the Introduction of Insecticide-Treated Bednets and Artemisinin-Based Combination Therapies: A Longitudinal Study.” *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (12). *Lancet Infect Dis*: 925–32. doi:10.1016/S1473-3099(11)70194-3.
- Verhaeghen, Katrijn, Wim Van Bortel, Patricia Roelants, Thierry Backeljau, and Marc Coosemans. 2006. “Detection of the East and West African Kdr Mutation in Anopheles Gambiae and Anopheles Arabiensis from Uganda Using a New Assay Based on FRET/Melt Curve Analysis.” *Malaria Journal* 5 (February). BioMed Central: 16. doi:10.1186/1475-2875-5-16.
- Vontas, J., J. P. David, D. Nikou, J. Hemingway, G. K. Christophides, C. Louis, and H. Ranson. 2007. “Transcriptional Analysis of Insecticide Resistance in Anopheles Stephensi Using Cross-Species Microarray Hybridization.” *Insect Molecular Biology* 16 (3). John Wiley & Sons, Ltd: 315–24. doi:10.1111/J.1365-2583.2007.00728.X.
- Wagman, Joseph, Idrissa Cissé, Diakalkia Kone, Seydou Fomba, Erin Eckert, Jules Mihigo, Elie Bankineza, et al. 2020. “Rapid Reduction of Malaria Transmission Following the Introduction of Indoor Residual Spraying in Previously Unsprayed Districts: An Observational Analysis of Mopti Region, Mali, in 2017.” *Malaria Journal* 19 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S12936-020-03414-2.
- Wagman, Joseph, Christelle Gogue, Kenzie Tynuv, Jules Mihigo, Elie Bankineza, Mamadou Bah, Diadier Diallo, et al. 2018. “An Observational Analysis of the Impact of Indoor Residual Spraying with Non-Pyrethroid Insecticides on the Incidence of Malaria in Ségou Region, Mali: 2012–2015.” *Malaria Journal* 17 (1). BioMed Central. doi:10.1186/S12936-017-2168-2.
- Weill, M., C. Malcolm, F. Chandre, K. Mogensen, A. Berthomieu, M. Marquine, and M. Raymond. 2004. “The Unique Mutation in Ace-1 Giving High Insecticide Resistance Is Easily Detectable in Mosquito Vectors.” *Insect Molecular Biology* 13 (1). *Insect Mol Biol*: 1–7. doi:10.1111/J.1365-2583.2004.00452.X.
- Wilkins, Elien E., Paul I. Howell, and Mark Q. Benedict. 2006. “IMP PCR Primers Detect

- Single Nucleotide Polymorphisms for Anopheles Gambiae Species Identification, Mopti and Savanna RDNA Types, and Resistance to Dieldrin in Anopheles Arabiensis.” *Malaria Journal* 5 (2). BioMed Central: 125. doi:10.1186/1475-2875-5-125.
- Williamson, Martin S., David Martinez-Torres, Caroline A. Hick, and Alan L. Devonshire. 1996. “Identification of Mutations in the Housefly Para-Type Sodium Channel Gene Associated with Knockdown Resistance (Kdr) to Pyrethroid Insecticides.” *Molecular & General Genetics : MGG* 252 (1–2). Mol Gen Genet: 51–60. doi:10.1007/BF02173204.
- Wondji, Charles S., Roch K. Dabire, Zainab Tukur, Helen Irving, Rousseau Djouaka, and John C. Morgan. 2011. “Identification and Distribution of a GABA Receptor Mutation Conferring Dieldrin Resistance in the Malaria Vector Anopheles Funestus in Africa.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41 (7). Elsevier: 484. doi:10.1016/J.IBMB.2011.03.012.
- Wood, O. R., S. Hanrahan, M. Coetzee, L. L. Koekemoer, and B. D. Brooke. 2010. “Cuticle Thickening Associated with Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector Anopheles Funestus.” *Parasites & Vectors* 3 (1). BioMed Central: 67. doi:10.1186/1756-3305-3-67.
- Wragge, Sue Ellen, Nelius Venter, Dramane Touré, Richard H. Hunt, and Maureen Coetzee. 2021. “New Distribution Record of Anopheles Rivulorum-like from Sadiola, Mali, with Notes on Malaria Vector Insecticide Resistance.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 115 (5). Trans R Soc Trop Med Hyg: 495–99. doi:10.1093/TRSTMH/TRAA113.

# ANNEXES

## 10 ANNEXE

### 10.1 Annexe1 : Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme

1. L'opérateur enfle des gants. Six feuilles de papier blanc propre (12 x 15 cm), enroulées sous forme de cylindre, sont introduites dans six tubes d'observation (avec une pastille verte), à raison d'une par tube, et plaquées contre la paroi du tube par un clip métallique, doté d'un ressort en acier. Un tiroir à plaque coulissante est fixé à l'autre extrémité de chaque tube.
2. En principe, on aspire 120 à 150 moustiques femelles (sous forme de lots) dans une cage à moustiques pour les transférer à l'intérieur de six tubes d'observation à pastille verte, à travers l'orifice de remplissage dans le tiroir à plaque coulissante, afin d'obtenir six échantillons répliqués comprenant 20 à 25 moustiques par tube.
3. Une fois les moustiques transférés, on ferme le dispositif d'obturation à plaque coulissante et on place les tubes d'observation en position verticale pendant une heure. À la fin de ce laps de temps, on retire tous les moustiques moribonds (c'est-à-dire incapables de voler) et les moustiques morts.
4. L'opérateur introduit un papier imprégné d'huile (papier témoin) dans chacun des tubes portant une pastille jaune, en s'assurant que l'étiquette de ce papier est visible de l'extérieur du tube. Le papier est fixé à l'aide d'un clip en cuivre et le tube est fermé avec un bouchon visse.
5. On prépare quatre tubes d'exposition portant une pastille rouge pratiquement de la même façon que les tubes marqués d'une pastille jaune. On tapisse chacun de ces tubes d'exposition avec une feuille de papier imprégné d'insecticide de manière à ce que l'étiquette imprimée de celle-ci soit visible de l'extérieur. On fixe ensuite chaque feuille de papier en place contre la paroi du tube avec un clip à ressort en cuivre et on ferme le tube avec un bouchon visse.
6. On fixe les tubes d'exposition vides dans les positions vacantes des tiroirs à plaque d'obturation coulissante, cette plaque étant ouverte, puis on transfère les moustiques vers les tubes d'exposition en soufflant doucement. Une fois tous les moustiques parvenus dans les tubes d'exposition, on ferme le dispositif à plaque coulissante (habituellement, on introduit un tampon de coton hydrophile dans l'orifice pour obturer la plaque coulissante), puis on dévisse les tubes d'observation et on les met de côté. L'opérateur retire alors ses gants.

7. On maintient les moustiques dans les tubes d'exposition, eux-mêmes placés en position verticale, avec l'extrémité recouverte d'une toile métallique dirigée vers le haut, sur une période d'une heure (sauf mention contraire). On installe ensuite les tubes dans une zone en lumière réduite ou on place sur eux des disques en carton pour diminuer l'intensité lumineuse et dissuader les moustiques testés de se poser sur le couvercle en toile métallique.
8. A la fin de la période d'exposition d'une heure (ou plus pour certains composés, comme indiqué dans le Tableau 3.1), on retransfère les moustiques dans les tubes d'observation en inversant la procédure décrite à l'étape 6. On dévisse ensuite les tubes d'exposition des dispositifs d'obturation à plaque coulissante. On met un tampon de coton imbibé d'eau sucrée à 10 % sur l'extrémité des tubes d'observation comportant une toile métallique.
9. On maintient les moustiques dans les tubes d'observation pendant 24 heures (ou plus pour les composés à action lente). Pendant ce laps de temps, il est important de conserver les tubes dans un endroit à faible luminosité à l'intérieur d'un laboratoire ou d'une chambre/enceinte maintenue à  $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  avec une humidité relative de  $75\% \pm 10\%$ . On enregistrera la température et l'humidité au cours de la période de récupération.
10. A la fin de cette période (c'est-à-dire 24 heures après l'exposition, voire plus tardivement pour les composés à action lente), on décompte le nombre de moustiques morts et on l'enregistre. On considère qu'un moustique est vivant s'il est en mesure de voler, indépendamment du nombre de pattes qui lui reste. Tous les moustiques « knocked down » (en état de choc), qu'ils aient ou non perdu des pattes ou des ailes, sont considérés comme moribonds et comptés pour morts. Un moustique est classé comme mort ou « knocked down » s'il est immobile ou incapable de se lever ou de s'envoler.

Une fois le test de sensibilité achevé, on peut transférer les moustiques dans des tubes de micro-centrifugeuse individuels, clairement étiquetés et pourvus d'un bouchon permettant une fermeture étanche (en mettant les moustiques morts et les moustiques vivants dans des tubes séparés) pour les conserver jusqu'à ce qu'ils soient transférables dans les matériels adaptés pour l'identification des espèces et des tests supplémentaires, si nécessaire. La procédure est présentée schématiquement sur la Figure 10.

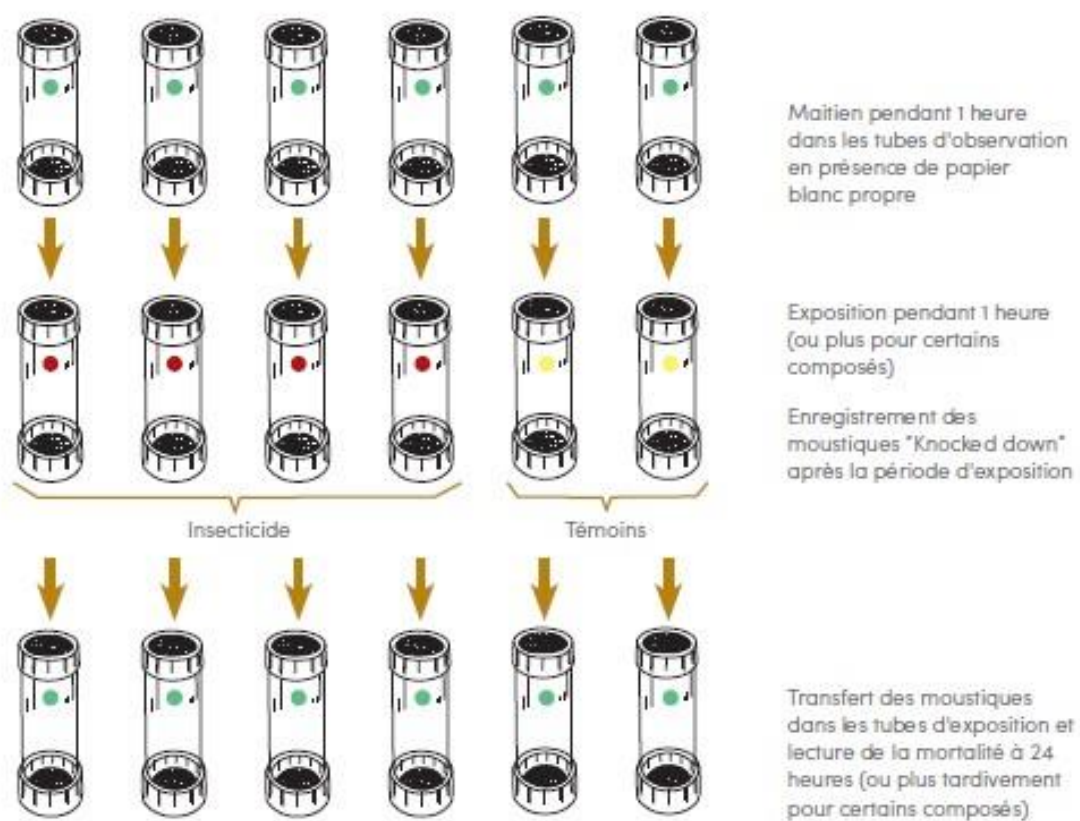


Figure 10 : les différentes étapes dans la réalisation du test de sensibilité de l'OMS

## 10.2 Annexe 2: Protocole d'extraction d'ADN avec le DNAzol

1. Homogénéiser le moustique avec 100 µl de DNAzol.
2. Centrifuger pour 10 minutes à 15°C.
3. Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes et jeter l'ancien tube.
4. Ajouter 50 µl d'éthanol 100 % dans chaque tube puis mixer en renversant gentiment environ 5 fois (ne pas vortexer pour risque de casser l'ADN), incubé à la température ambiante pour 5 minutes.
5. Centrifuger pour 10 minutes à 15°C et jeter le surnageant
6. Ajouter 1ml d'éthanol 75% et renverser les tubes 5 fois pour laver l'ADN puis centrifuger pour 5 minutes à 15 °C et verser gentiment l'éthanol 75%.
7. Répéter l'étape 6
8. Verser l'éthanol 75% et laisser au séchage jusqu'à la disparition du liquide à l'intérieur du tube (mais pas complètement sec sinon l'ADN serait difficile à resuspendre).
9. Resuspendre l'ADN avec 100 µl d'eau ou ½ XTE. NB : Si le pellet est sec, laisser l'ADN pour la nuit à 4°C pour maximiser la resuspension de l'ADN
10. Conserver à long terme à -20 et -80

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Noms:** KONGBO GBASSINGA

**Prénoms:** Wesley Jefferson Maurice

**Email :** [kwesleyjefferson@gmail.com](mailto:kwesleyjefferson@gmail.com)

**Titre de la thèse :** Sensibilité de *Anopheles gambiae s.l.* à quatre classes d'insecticides et fréquence allélique des gènes *kdr L1014F* et *ace 1 G119S* dans le cercle de Kati

**Année universitaire :** 2021-2022

**Ville de soutenance :** Bamako

**Nationalité :** Centrafricaine

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la faculté de Médecine Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOST) de Bamako

**Secteur d'intérêt :** Entomologie et Parasitologie Médicale

**Résumé :**

### INTRODUCTION

La situation de résistance multiple chez *An. gambiae s.l.* retrouvée au Mali avec la présence concomitante des mutations *kdr L1014F* et *ace-1 G119S* est particulièrement inquiétante et constitue une menace majeure en rendant les moustiques insensibles aux insecticides qui sont indispensables pour le succès des stratégies actuelles de lutte contre le paludisme au Mali. S'il est évident qu'avec les différents usages des insecticides (contrôlés ou non) il est difficile voire impossible d'éviter l'installation de la résistance à tout moment, il est crucial d'accompagner les stratégies de lutte antivectorielle contre le paludisme d'un système efficace de surveillance de la résistance aux insecticides. C'est dans ce cadre que se situe la présente étude dont le but est d'évaluer la sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* à ces classes d'insecticides à savoir les pyréthrinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates qui sont couramment utilisés en santé publique pour la lutte antivectorielle et la fréquence allélique des gènes *kdr L1014F* et *ace-1 G119S*.

### METHODOLOGIE ET RESULTATS

L'étude s'est déroulée de juin à octobre 2021 à Ouassorola et Sogolombougou dans le cercle de Kati, région de Koulikoro. Les bio-essais ont été faits suivant les procédures standards de l'OMS, l'identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* et la mise en évidence des mutations *kdr L1014F* et *ace 1* ont été faites par PCR.



Les taux de mortalité ont été respectivement à Ouassorola et Sogolombougou de : 100% et 91,25% pour le fénitrothion ; ; 97,5% et 92,5% pour le bendiocarbe ; 67,5% et 50% pour le DDT ; 8,75% et 0% pour la deltaméthrine 3,75% et 0% pour la perméthrine et 10% et 0% pour la lambda-cyhalothrine. Les fréquences alléliques de la mutation *kdr L1014F* étaient de 72,93% à Ouassorola et 79,67% à Sogolombougou et celles d'*ace 1* étaient de 25% à Ouassorola et 46,15% à Sogolombougou. *An. coluzzii* et *An. gambiae* étaient les seuls membres de *An. gambiae s.l.* identifiés dans les deux sites d'études. Il ressort de cette étude une forte résistance de *An. coluzzii* et *An. gambiae* à la deltaméthrine 0,05%, à la lambda-cyhalothrine 0,05%, à la perméthrine 0,75%, au DDT 4% et au bendiocarbe 0,1% . *An. gambiae s.l* était sensible au fénitrothion 1% à Ouassorola

### CONCLUSION

Il ressort de cette étude une forte résistance de *An. coluzzii* et *An. gambiae* à la deltaméthrine 0,05%, à la lambda-cyhalothrine 0,05%, à la perméthrine 0,75%, au DDT 4% et au bendiocarbe 0,1% . *An. gambiae s.l* était sensible au fénitrothion 1% à Ouassorola. Il a été observé une fréquence élevée des mutations *kdr L1014F* et *Ace-1 G119S* dans les deux villages.

Les espèces du complexe *An. gambiae s.l.* retrouvées étaient *An. gambiae* et *An. coluzzii*.

**Mots clés :** *Anopheles gambiae s.l.* ; résistance ; insecticides ; *kdr L1014F* ; *ace 1*.

## DATA SHEET

**Names:** KONGBO GBASSINGA

**First names:** Wesley Jefferson Maurice

**Email:** kwesleyjefferson@gmail.com

**Title of the thesis:** Sensitivity of *Anopheles gambiae s.l.* to four classes of insecticides and allelic frequency of the *kdr L1014F* and *ace 1 G119S* genes in the Kati circle

**Academic year:** 2021-2022

**City of defense:** Bamako

**Nationality:** Central African Republic

**Place of deposit:** Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology (FMPOST) of Bamako

**Area of interest:** Entomology and Medical Parasitology

**Summary:**

### INTRODUCTION

The situation of multiple resistance in *An. gambiae s.l.* found in Mali with the concomitant presence of the *kdr L1014F* and *ace-1 G119S* mutations is particularly worrying and constitutes a major threat by rendering mosquitoes insensitive to insecticides which are essential for the success of current malaria control strategies in Mali. While it is obvious that with the different uses of insecticides (controlled or not) it is difficult if not impossible to avoid the installation of resistance at any time, it is crucial to accompany malaria vector control strategies with an efficient insecticide resistance monitoring system. It is within this framework that the present study was conducted to evaluate the susceptibility of *Anopheles gambiae s.l.* to these classes of insecticides, namely pyrethroids, organochlorines, organophosphates and carbamates, which are commonly used in public health for vector control, and the allelic frequency of the *kdr L1014F* and *ace-1 G119S* genes.

### METHODOLOGY AND RESULTS

The study took place from June to October 2021 in Ouassorola and Sogolombougou in the Kati circle, Koulikoro region. Bioassays were done according to WHO standard procedures, the

identification of *An.gambiae s.l.* species and the detection of the *kdr L1014F* and *ace 1 G119S* mutations were done by PCR.

The mortality rates were respectively in Ouassorola and Sogolombougou of : 100% and 91.25% for fenitrothion; ; 97.5% and 92.5% for bendiocarb; 67.5% and 50% for DDT; 8.75% and 0% for deltamethrin 3.75% and 0% for permethrin and 10% and 0% for lambda-cyhalothrin. The allelic frequencies of the *kdr L1014F* mutation were 72.93% in Ouassorola and 79.67% in Sogolombougou and those of *ace 1* were 25% in Ouassorola and 46.15% in Sogolombougou. *An. coluzzii* and *An. gambiae* were the only members of *An. gambiae s.l.* identified in both study sites. This study showed strong resistance of *An. coluzzii* and *An. gambiae* to deltamethrin 0.05%, lambda-cyhalothrin 0.05%, permethrin 0.75%, DDT 4% and bendiocarb 0.1%. *An. gambiae s.l* was sensitive to fenitrothion 1% at Ouassorola.

## CONCLUSION

This study showed a strong resistance of *An. coluzzii* and *An. gambiae* to deltamethrin 0.05%, lambda-cyhalothrin 0.05%, permethrin 0.75%, DDT 4% and bendiocarb 0.1%. *An. gambiae s.l* was susceptible to fenitrothion 1% in Ouassorola. A high frequency of *kdr L1014F* and *Ace-1 G119S* mutations was observed in both villages. The species of the *An. gambiae s.l.* complex found were *An. gambiae* and *An. coluzzii*.

**Keywords:** *Anopheles gambiae s.l.*; Resistance; insecticides; *Kdr L1014F*; *ace 1*.

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur Enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec Conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, la probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers les Malades et de sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et Mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes Criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes Promesses.

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le Jure!