

Identification des mécanismes impliqués dans la résistance observée chez *Anopheles gambiae* sensu lato dans la zone d'Oyem (Nord du Gabon)

[Identification of the mechanisms involved in the resistance observed in *Anopheles gambiae* sensu lato in the Oyem area (Northern Gabon)]

Pyazzi Obame Ondo Kutomy^{1,2}, Roland Christophe Zinga Koumba³, Aubin Armel Koumba³, Seynabou Diedhiou Mocote¹, Coumba Diouf¹, Ousmane Faye¹, and Jacques François Mavoungou^{3,4}

¹Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD), BP: 5005, Dakar-Fann, Senegal

²Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), BP: 50 Libreville, Gabon

³Institut de Recherche en Ecologie Tropicale (IRET), BP: 13354, Libreville, Gabon

⁴Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM) BP: 941, Franceville, Gabon

Copyright © 2023 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The resistance of malaria vectors to insecticides used in vector control is a major obstacle for national malaria control programs. It is in this context that an entomological study was conducted in urban, peri-urban and rural sites in the Oyem area (Northern Gabon). This study looks at species of the *An. gambiae* complex and the resistance mechanisms developed by *Anopheles* to escape to insecticides in Oyem, northern Gabon. To this end, *Anopheles* larvae were collected in the above-mentioned areas and reared to the adult stage in the field laboratory. Subsequently, the adult *Anopheles* were subjected to sensitivity tests following the World Health Organization protocol.

Seven insecticides (DDT 4%, Deltamethrin 0.05%, Permethrin 0.75%, Lambda-cyhalothrin 0.05%, Cyfluthrin 0.15%, Bendiocarb 0.1% and Malathion 5%) were used for these bioassays. The mosquitoes tested (live and dead) were analyzed using PCR to identify the species of the *An. gambiae* complex. The results obtained showed that the species *Anopheles gambiae*, the only species identified, has resistance to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT 4%) and Pyrethroids. However, this species is sensitive to Bendiocarb 0.1% and Malathion 5%. These statuses are confirmed by the presence of Kdr mutations (East and West) and the absence of the Ace-1R mutation in this vector.

KEYWORDS: *Anophèles gambaie*, Insecticides, Kdr, Ace-1R, Oyem, Gabon.

RESUME: La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle est un obstacle majeur pour les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. C'est dans ce contexte qu'une étude entomologique a été menée en zone urbaine, péri-urbaine et rurale dans la zone d'Oyem (Nord du Gabon). Cette recherche s'intéresse aux mécanismes de résistance développés par les espèces du complexe *An. gambaie* pour échapper aux insecticides à Oyem au Nord du Gabon. A cet effet, des larves d'anophèles ont été collectées dans les zones précitées, puis élevées jusqu'au stade adultes au laboratoire de terrain. Par la suite, les anophèles adultes ont été soumis aux tests de sensibilité suivant le protocole de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Sept insecticides (DDT 4%, Deltaméthrine 0,05%, Permétrine 0,75%, Lambda-cyhalothrine 0,05%, Cyfluthrine 0,15%, Bendiocarbe 0,1% et Malathion 5%) ont été utilisés pour ces bioéssais. Les moustiques testés (vivants et morts) ont été analysés via la PCR afin d'identifier les espèces du complexe *An. gambiae*. Les résultats obtenus ont montré que l'espèce *Anopheles gambiae*, seule espèce identifiée, présente une résistance au dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT 4%) et aux Pyréthrinoides.

Cependant, cette espèce est sensible au Bendiocarbe 0,1% et au Malathion 5%. Ces statuts sont confirmés par la présence des mutations Kdr (East et West) et l'absence de la mutation Ace-1^R chez ce vecteur.

MOTS-CLEFS: *Anophèles gambaie*, Insecticides, Kdr, Ace-1^R, Oyem, Gabon.

1 INTRODUCTION

Malgré les efforts nationaux et internationaux, le paludisme reste la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde [1, 2]. C'est une maladie humaine potentiellement mortelle causée par des parasites transmis à l'homme à travers des piqûres des femelles d'anophèles infectées [2]. En 2021, on dénombrait 247 millions de cas et 619 000 décès associés à cette parasitose à travers le monde [3]. Le continent africain continue de supporter le fardeau le plus lourd de cette pathologie avec 234 millions (95%) de cas et 593 000 (96%) décès [3]. Au Gabon, la quasi-totalité de la population court un risque élevé de contracter le paludisme [4]. Cette endémie y est stable avec une transmission permanente toute l'année et une prévalence moyenne de 22,3% [5].

Dans ce pays d'Afrique centrale, le paludisme est le principal facteur de morbidité [6], avec un taux d'inoculation entomologique pouvant atteindre environ 1 000 piqûres d'anophèles femelles infectées par personne [7]. En effet, en 2020, les nombres annuels déclarés positifs au paludisme s'élevaient à 127 500 cas contre 224 décès [4].

Pour combattre cette parasitose, la stratégie de lutte antipaludique adoptée repose globalement sur la lutte contre les vecteurs du paludisme au stade adulte à travers l'usage des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide (MII) [8].

Malencontreusement, les avantages offerts par ces outils de lutte sont fortement menacés par l'apparition des résistances aux insecticides chez les populations anophéliennes en Afrique subsaharienne [8, 9, 10]. Des études antérieures ont déjà rapporté des cas de résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides dans les pays voisins [11, 12, 13, 14].

Au Gabon, ces phénomènes ont été signalés par certains auteurs à Libreville [15], Mouila [16] et Lambaréné [17]. Peu de données existent sur les localités frontalières comme la ville d'Oyem. Pour combler ce manquement, nous avons entrepris cette étude qui se propose de déterminer la sensibilité aux insecticides utilisés en santé publique et les mécanismes de résistance des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. d'Oyem, en vue de la mise en place d'une stratégie de lutte adaptée aux réalités locales.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 ZONE D'ÉTUDE

Cette étude a été réalisée dans les zones urbaines, péri-urbaines et rurales de la ville d'Oyem en juillet 2020 (saison sèche) et en mi-novembre – mi-décembre 2020 (saison des pluies).

Située entre 1° 37' 00" de latitude Nord et 11° 35' 00" de longitude Est, la ville d'Oyem est le chef-lieu de la province du Woleu-Ntem (Nord du Gabon). Cette localité qui est la quatrième ville du pays après Libreville, Franceville et Port Gentil, est peuplée de 80 000 habitants. Son emprise spatiale s'étend sur près de 38 465 km². Son climat est de type équatorial humide caractérisé par une alternance des saisons pluvieuses et des saisons sèches [18]. Son relief est formé de plateaux et collines à pentes douces séparés par des cours d'eau et des lacs.

La végétation d'Oyem est composée des forêts marécageuses et des forêts secondaires servant de zones de culture aux habitants. Ces derniers y cultivent le manioc (*Manihot esculenta*), la canne à sucre (*Saccharum officinarum*), la banane (*Musa paradisiaca*), l'ananas (*Ananas comosus*), le café (*Coffea arabica*), le cacao (*Theobroma cacao*) et bien d'autres spéculations agricoles.

2.2 SITES PROSPECTÉS

Dans le cadre de cette étude, trois (3) sites d'échantillonnage ont été retenus en suivant le gradient d'urbanisation et en allant de la zone urbaine vers la zone rurale en passant par la zone péri-urbaine (Figure 1).

Dans la zone urbaine, huit (8) quartiers dont Akoakam, Methui, Mekaga, Ngouema, Eyenassi, Adzougou, Nkomayate et Adzabelone ont été prospectés. Cette zone dépourvue de forêt et bien drainée, est caractérisée par une urbanisation anarchique de l'espace et par la proximité des habitations avec les marécages, les rivières [19].

En zone péri-urbaine, trois (3) quartiers (Angone, Mekom-Nkodje et Ewormokok) ont été échantillonnés. Dans cette zone, les habitations sont construites avec des matériaux lourds (briques) et des matériaux légers (planches, tôles, etc.). Cette zone est colonisée par des forêts secondaires marécageuses exploitées par les populations pour leurs activités agricoles de type paysan [20]. Cette zone est bien drainée, avec un lac au quartier Ewormokok et de nombreuses rivières [19].

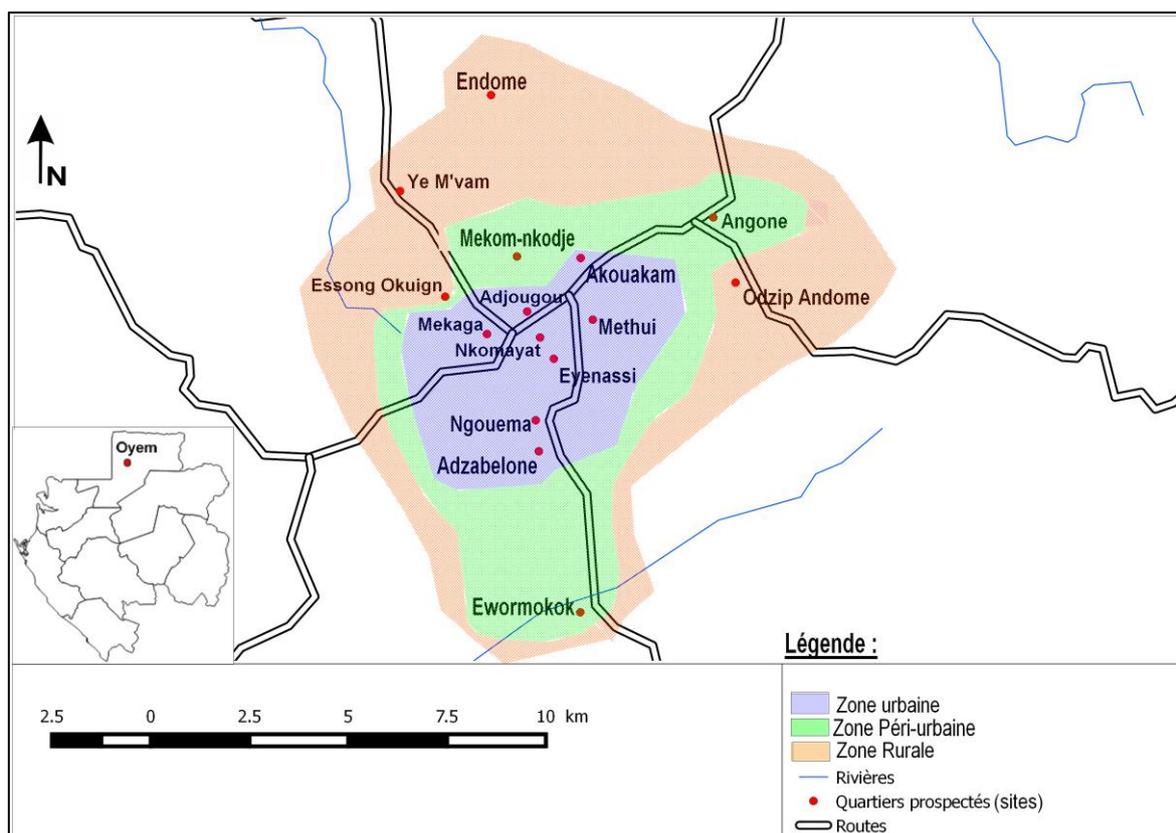


Fig. 1. Localisation de la zone d'Oyem et des sites d'étude (Obame et al., 2021).

Pour terminer, dans la zone rurale, quatre (4) villages tels que Andome-Odzip, Endome, Essong-Okuign et Ye'Mvam ont été sillonnés. Les habitations y sont majoritairement construites le long des routes avec des matériaux légers (planches, tôles et terre battue). Cette zone est peuplée de forêts secondaires et marécageuses où les habitants font de l'agriculture paysanne [19]. Il y a aussi la présence des rivières Nyè au village Essong-Okuign et Andome à Odzip-Andome.

2.3 COLLECTE LARVAIRE ET ÉLEVAGE DES MOUSTIQUES

Les moustiques ont été collectés à l'état larvaire dans les quartiers et les villages d'Oyem susmentionnés. Les larves ont été prélevées dans différentes collections d'eau de taille et de nature variées (récipients domestiques, de pneus, de fosses septiques, de briques, de caniveaux, de flaques d'eau, de marécages et de lacs) en utilisant la méthode de dipping [21]. Cette technique a consisté à collecter les larves de moustiques dans les gîtes larvaires avec des louches. Les larves récoltées ont été transportées au laboratoire où elles ont été triées par genre et mises dans des bacs d'élevage contenant de l'eau des gîtes [22]. Ces larves ont été quotidiennement nourries avec un aliment pour poissons d'ornement finement émiettée [19]. puis élevées jusqu'à l'émergence des imagos. Les adultes obtenus ont été nourris à l'eau sucrée à 10%.

2.4 TESTS DE SENSIBILITÉ AUX INSECTICIDES ET IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES MOUSTIQUES

Les tests de sensibilité ont été effectués avec les femelles d'anophèles provenant du quartier Nguema (zone urbaine), du quartier Ewormokok (zone péri-urbaine) et du village Odzip-Andome (zone rurale) à jeun âgées de 3 à 5 jours issues des élevages. Ces essais biologiques ont été réalisés selon le protocole standard de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour adultes (OMS, 2017). Sept (7) insecticides appartenant à quatre (4) familles ont été utilisés pour ces tests, à savoir:

- Organochlorés: DDT 4%;
- Pyréthrinoides: Deltaméthrine 0,05%, Permethrine 0,75%, Lambda-cyhalothrine 0,05% et Cyfluthrine 0,15%;
- Carbamates: Bendiocarbe 0,1%;
- Organophosphorés: Malathion 5%.

Toutes les femelles d'anophèles testées ont été identifiées morphologiquement comme appartenant au complexe *Anopheles gambiae* en utilisant la clef d'identification des Culicidae d'Afrique Centrale de Baldacchino & Paupy [23] et la clef de détermination des femelles d'anophèles d'Afrique tropicale [24]

Au total, 4 lots de 20 femelles d'anophèles ont été utilisés durant les essais biologiques. Pour chaque test, les lots de moustiques ont été mis en observation pendant 60 minutes dans des tubes pourvus de papier non imprégné, puis, les femelles ont été mises en contact avec l'insecticide, dans des tubes pourvus de papier imprégné. Par contre, des tubes témoins pourvus de papier non-imprégné ont été utilisés. Pendant 60 minutes (période d'exposition), l'effet Knock-down a été observé toutes les 5 à 10 minutes. À la fin, les femelles ont été transférées dans des tubes d'observation. Par la suite, un coton imbibé d'une solution sucrée à 10% a été placé sur chaque tube d'observation pour nourrir les femelles d'anophèles. Enfin, la mortalité a été estimée 24 heures après l'exposition [25].

Tous les spécimens de moustiques testés ont été conditionnés en deux lots (les morts et les survivants) et conservés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant du silicagel en vue des analyses de biologie moléculaire (identification des espèces et recherche de gènes de résistance).

2.5 ANALYSE DES DONNÉES

Les temps de knock-down désignant le temps nécessaire pour que 50% (KdT50) et 95% (KdT95) d'anophèles soient assommés après 1 heure d'exposition avec un insecticide, ont été calculés en utilisant le logiciel Polo Plus version 1.0.

Par contre, les taux de mortalité observés après 24 heures ont été obtenus en divisant le nombre de femelles tuées par le nombre total de femelles d'anophèles testées pour chaque insecticide.

L'interprétation des résultats des tests de sensibilité a été basée sur les critères de validité définis par l'OMS [25], à savoir:

- Résistance: si la mortalité est inférieure à 90%;
- Sensibilité: si la mortalité est supérieure à 98%;
- Résistance probable (à confirmer): si la mortalité est comprise entre 90% et 97%.

2.6 IDENTIFICATION DES FORMES MOLÉCULAIRES DU COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE*

Tous les anophèles testés appartenant au complexe *An. gambiae* ont été identifiés à partir de la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR). Le protocole de Wilkins *et al.* [26] a été utilisé afin de déterminer les formes moléculaires S (*An. gambiae*) et M (*An. coluzzii*) du complexe *An. gambiae*.

2.7 RECHERCHE DES GÈNES DE RÉSISTANCE KDR ET ACE-1^R

La détection de la mutation Kdr a été réalisée par PCR en appliquant une variante de la technique de Huynh *et al* [27]. Cette méthode est basée sur l'usage des amorces à mésappariement intentionnel telles que :

IPCF <GATAATGTGGATAGATTCCCGACCATG>,

ALTREV<TGCCGTTGGTGCAGACAAGGATG>,

WT<GGTCCATGTTAATTTGCATTACTTACGAATA>,

EAST <CTTGCCACTGTAGTGATAGGAAATC>, et la Taq polymérase pour diagnostiquer par l'amplification les allèles résistants et sensibles.

Le protocole décrit et employé par Wilkins *et al.* [26] a permis de diagnostiquer la présence des gènes de résistance Kdr-West (L1014F) et Kdr-East (L1014S) et de définir les génotypes homozygotes résistants (RR), homozygotes sensibles (SS) et hétérozygotes (RS). L'évaluation de la fréquence de la mutation Kdr par site d'étude a été réalisée grâce au logiciel Excel 2013.

Par contre, le diagnostic de la mutation Ace-1^R a été fait via la technique de PCR en appliquant la méthode de Weill *et al.* [28] simplifiée par Wilkins *et al.* [26]. Elle a consisté à utiliser des amorces spécifiques, notamment 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> et la Taq polymérase pour rechercher par l'amplification, les allèles résistants et sensibles.

Pour les mutations Kdr-West et Kdr-East, le calcul de la fréquence de la mutation Kdr dans les populations d'*An. gambiae* de la zone d'Oyem a été réalisé dans le tableur Excel 2013 en appliquant le modèle d'Hardy-Weinberg pour système tri-allélique. Par la suite, le test de Khi-2 a été réalisé à l'aide du logiciel Python version 3.10.6 afin de comparer les fréquences alléliques R_w et R_e avec un seuil de significativité de 5%.

3 RESULTATS

3.1 MORTALITÉ DES ANOPHÈLES TESTÉS SUIVANT LES ZONES PROSPECTÉES

Au total, 1680 femelles d'*Anopheles gambiae* s.l. issues de trois (3) types de zone (urbaine, péri-urbaine et rurale) ont été testées. Ces anophèles sont résistants au DDT 4%, à la Deltaméthrine 0,05%, à la Perméthrine 0,75%, à la Lambda-cyhalothrine 0,05% et à la Cyfluthrine 0,15%.

Une forte résistance de ces anophèles au DDT 4% a été enregistrée en zone péri-urbaine (Tableau 2). En effet, cet insecticide a présenté la mortalité la plus faible par rapport aux autres insecticides avec un pourcentage de 3%. En revanche, la Deltaméthrine a présenté les taux de mortalité les plus importants en zone urbaine, péri-urbaine et rurale avec des pourcentages respectifs de 70%, 75% et 93%. Quant à la Cyfluthrine, elle a enregistré les plus faibles taux de mortalité avec 35% de mortalité (zone urbaine) et 30% de mortalité (zone péri-urbaine). La Lambda-cyhalothrine a présenté un taux de mortalité 18% en zone rurale. Toutefois, les populations d'anophèles des sites d'étude restent sensibles aux insecticides de classe des Carbamates (Bendiocarbe 0,1%) et celle des Organophosphorés (Malathion 5%), avec des mortalités de 100% (Tableau 2).

3.2 EFFET KNOCK-DOWN (Kd)

Aussi bien en zone urbaine qu'en zone rurale, les KdT50 et KdT95 relatif au DDT 4% sont supérieurs à 60 min. En revanche, en zone péri-urbaine, aucun Kd n'a été observé. Pour la Deltaméthrine, les résultats révèlent qu'en zone urbaine, péri-urbaine et rurale, les KdT50 sont respectivement de 35,499 min, 39,892 min et 43,284 min. Pour cet insecticide, les KdT95 sont supérieurs à 60 min pour les anophèles issus de ces trois zones.

En présence de la Perméthrine, en zone urbaine et rurale, les KdT50 sont respectivement de 50,495 min et 33,503 min. Cependant, les KdT95 pour cet insecticide sont supérieurs à 60 min. S'agissant de la Lambda-cyhalothrine et de la Cyfluthrine, ils ont enregistré des KdT50 et KdT90 supérieurs à 60 min dans les trois (3) types de sites. Au regard de ces temps de knock-down, il convient de signaler que la Deltaméthrine est le seul insecticide qui a assommé plus de 50% de la population d'*An. gambiae* s.l. de la zone d'Oyem en moins de 1 h d'exposition (Tableau3).

Tableau 1. Synthèse des taux de mortalité et profils de sensibilité des anophèles de la zone d'Oyem

INSECTICIDES	Effectif testé	ZONE URBAINE		ZONE PERI-URBAINE		ZONE RURALE	
		Mortalité (%)	Statut	Mortalité (%)	Statut	Mortalité (%)	Statut
DDT 4%	80	15	Résistant	3	Résistant	25	Résistant
Deltaméthrine 0,05%	80	70	Résistant	75	Résistant	93	Résistant
Perméthrine 0,75%	80	53	Résistant	53	Résistant	63	Résistant
Lambda-cyhalothrine 0,05%	80	48	Résistant	35	Résistant	18	Résistant
Cyfluthrine 0,15%	80	35	Résistant	30	Résistant	43	Résistant
Bendiocarbe 0,1%	80	100	Sensible	100	Sensible	100	Sensible
Malathion 5%	80	100	Sensible	100	Sensible	100	Sensible

Tableau 2. Effet Knock-down (Kd) des populations d'*An. gambiae* de la zone d'Oyem

INSECTICIDES	ZONE URBAINE		ZONE PERI-URBAINE		ZONE RURALE	
	KdT50 (IC)	KdT95 (IC)	KdT50 (IC)	KdT95 (IC)	KdT50 (IC)	KdT95 (IC)
DDT 4%	109,155 (82,734-179,074)	537,212 (285,262-1750,958)	No KD	No KD	156,442 (90,807 - 882,561)	962,636 (302,238 - 45955,258)
Deltaméthrine 0,05%	35,499 (30,451 - 42,521)	140,517 (99,372-246,583)	39,892 (32,859 - 51,759)	147,898 (95,570 - 356,111)	43,284 (37,494 - 52,035)	156 (110,556 - 275,089)
Perméthrine 0,75%	50,495 (40,598-71,563)	208,942 (123,848 -617,134)	990,926 (272,410 -64216,146)	114313,628 (6141,863 - 1702411947,015)	33,503 (31,010 - 36,302)	96,286 (81,866 - 119,156)
Lambda-cyhalothrine 0,05%	185,929 (114,320-565,855)	1242,116 (448,038 - 13655,929)	104,199 (79,389 - 166,045)	598,718 (314,483-1904,216)	200,851 (92,195 -4218,579)	3419,643 (555,032 - 6162043,892)
Cyfluthrine 0,15%	68,064 (57,525 - 86,758)	332,365 (215,329 -656,624)	152,814 (88,462 - 646,224)	1443,241 (418,009 - 45643,528)	60,478 (52,539 - 73,274)	257,963 (179,676 - 444,893)

No Kd: Perte totale de l'effet Knock-down (moins de 10% de moustiques assommés après 60 minutes d'exposition); IC: Intervalle de Confiance à 95%; KdT50 et KdT95

3.3 IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES DU COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE*

Près de 504 échantillons de moustiques ont été conditionnés pour l'identification moléculaire des espèces du complexe *Anopheles gambiae*. Sur les 504 échantillons analysés, un total de 484 spécimens étaient des *Anopheles gambiae* et 20 individus n'ont pu être identifiés.

3.4 RECHERCHE DES GÈNES DE RÉSISTANCE KDR ET ACE-1^R

Les résultats des analyses PCR ont révélé une coexistence des mutations Kdr-East et Kdr-West. Sur les 484 spécimens analysés, 439 étaient des individus homozygotes résistants (RwRw) avec une fréquence de 90,7. Une fréquence de 9,3 a été déterminée pour l'hétérozygote RwRe, révélant une co-occurrence des deux (2) mutations chez 45 individus.

Aucun individu homozygote (SS) ou hétérozygote (SRw ou SRe) n'a été détecté. L'analyse totale de la coexistence des mutations Kdr-East et Kdr-West a montré une prédominance de l'allèle Rw avec une fréquence de 95,4 par rapport à l'allèle Re dont la fréquence allélique est de 4,6 (Tableau 4). Il y a une différence significative entre les fréquences alléliques Rw et Re ($X^2 = 81,72$; p-value = $1,57e^{-19}$).

Tableau 3. Fréquence génotypique et allélique des populations d'*An. gambiae* à Oyem

	Fréquence génotypique							Fréquence allélique			
	SS	SRw	SRe	RwRw	RwRe	ReRe	Total	S	Rw	Re	Total
N	0	0	0	439	45	0	464	0	923	45	968
F	0	0	0	90,7	9,3	0	100	0	95,4	4,6	100

N: Effectif; F: Fréquence = (N/Total) x100

L'analyse par zone d'étude a montré les mêmes tendances que l'analyse globale. En effet, on a noté une prédominance des individus homozygotes résistants (RwRw) sur les hétérozygotes résistants (RwRe). Selon les zones prospectées, on a observé une prédominance des gènes Kdr-West avec des fréquences alléliques respectives de 92,9; 96,3 et 95,9 comparé aux gènes de résistance Kdr-East dont les fréquences alléliques respectives ont été de 7,1; 3,7 et 4,1 (Tableau 5). De plus, il existe des différences significatives entre les fréquences alléliques Rw et Re ($\chi^2 > 73$; p -value < 0,05). Les résultats des analyses moléculaires ont révélé l'absence de gène de résistance Ace-1^R qui confère aux anophèles la résistance aux insecticides des classes des Carbamates et des Organophosphorés.

Tableau 4. Fréquence génotypique et allélique d'*An. gambiae* en fonction des zones étudiées

Zones		Fréquence génotypique							Fréquence allélique			
		SS	SRw	SRe	RwRw	RwRe	ReRe	Total	S	Rw	Re	Total
Urbaine	N	0	0	0	121	20	0	141	0	262	20	282
	F	0	0	0	85,8	14,2	0	100	0	92,9	7,1	100
Péri-urbaine	N	0	0	0	172	12	0	164	0	316	12	328
	F	0	0	0	92,7	7,3	0	100	0	96,3	3,7	100
Rurale	N	0	0	0	146	13	0	159	0	305	13	318
	F	0	0	0	91,8	8,2	0	100	0	95,9	4,1	100

N: Effectif; F: Fréquence = (N/Total) x100

4 DISCUSSION

Les résultats d'analyses moléculaires ont révélé que les espèces du complexe *An. gambiae* au niveau d'Oyem ne sont représentées que par *An. gambiae*. Les larves de cette espèce semblent être inféodées aux gîtes larvaires prospectés dans les trois zones d'étude (urbaine, péri-urbaine et rurale). Aussi, l'abondance de cette espèce pourrait s'expliquer par le fait que les zones échantillonnées présentent des conditions écologiques favorables au développement de ses larves. Toutefois, ces résultats sont contraires à ceux de Mourou *et al.* [15] et de Koumba *et al.* [8] qui ont signalé la présence de plusieurs espèces du complexe *An. gambiae* dans trois provinces du Gabon. En effet, Mourou *et al.* [15] ont mis en évidence l'existence d'*An. gambiae*, d'*An. melas* et d'*An. coluzzii* à Libreville (Province de l'Estuaire) et à Port-Gentil (Province de l'Ogooué Maritime). Par contre, Koumba *et al.* [8] ont mis en évidence la présence d'*An. gambiae* et d'*An. coluzzii* à Mouila dans la province de la Ngounié.

Les études d'Etang *et al.* [29] et Mbida *et al.* [30] au Cameroun ont révélé qu'*An. gambiae* et *An. coluzzii* se développent dans les mêmes gîtes larvaires, à savoir les récipients de stockage d'eau, les récipients abandonnés et les pneus. Dans le cadre de cette étude, les larves d'*Anopheles gambiae* ont été récoltées dans les récipients domestiques, les pneus, les fosses septiques, les briques, les caniveaux, les flaques d'eau, les marécages et les lacs. L'absence d'*An. coluzzii* dans nos collections pourrait s'expliquer par la période d'étude et par le type de gîtes où les larves d'anophèles ont été collectées. Selon Mbida *et al.* [30], *An. gambiae* préfère les gîtes permanents tandis qu'*An. coluzzii* affectionne les collections d'eau temporaires. Au cours de cette étude, ce sont les collections d'eau où les larves d'anophèles ont été prélevées étaient majoritairement des gîtes temporaires. En revanche, l'absence des autres espèces du complexe *An. gambiae* telles qu'*An. arabiensis*, *An. melas* et *An. merus* est liée au fait que les larves de ces espèces anophéliennes sont absentes des zones forestières [31] et des eaux non saumâtres comme c'est le cas pour la zone d'Oyem.

Les résultats des tests de sensibilité aux insecticides traduisent une résistance d'*An. gambiae* au DDT et aux Pyréthriinoïdes (Deltaméthrine, Permethrine, Lambda-cyhalothrine, Cyfluthrine) dans la zone d'étude. Ces résultats sont en accord avec ceux de Koumba *et al.* [8, 9], L'usage à grande échelle du DDT en 1950 lors des campagnes de démoustication [32] et l'utilisation

excessive des Pyréthriinoïdes contre les ennemis de cultures depuis 1970 et leur emploi dans la lutte antivectorielle via les campagnes de distribution des MILDA ont probablement contribuer à sélectionner la résistance [33, 34]. D'ailleurs, Obame *et al.* [19] a indiqué que les ménages de la zone d'Oyem utilisent fortement les moustiquaires imprégnées de Deltaméthrine. Par ailleurs, certains agriculteurs de la zone d'Oyem utilisent beaucoup les insecticides (ex: deltaméthrine, lambda-cyhalothrine) pour protéger leurs cultures et leurs champs contre les insectes ravageurs [19]. Ces phénomènes de résistance des anophèles aux Pyréthriinoïdes semblent être généralisés [8, 9, 15, 17].

Cette situation pourrait avoir des conséquences négatives sur l'efficacité des MILDA en termes de protection physique des populations humaines [35, 36]. La résistance aux Pyréthriinoïdes observée chez les populations anophéliennes d'Oyem est probablement liée à une insensibilité nerveuse résultant d'une modification du site d'action (canaux sodium voltage dépendants) régie par le gène Kdr-West et Kdr-East [8, 33, 37]. D'ailleurs, de fortes fréquences alléliques de Kdr-West (>90%) ont été relevées dans les populations d'anophèles d'Oyem. Par ailleurs, la présence du gène Kdr observée à la fois chez les moustiques survivants que ceux morts après les tests de sensibilité, suggère la présence d'autres mécanismes impliqués dans la résistance (résistance comportementale, résistance cuticulaire, etc.) de ces moustiques aux insecticides.

Par contre, la susceptibilité au Bendiocarbe (Carbamates) et au Malathion (Organophosphorés) a été observée chez les anophèles de la zone d'étude. Cette sensibilité serait due à la non utilisation (ou faible usage) de ces composés organiques de synthèse en santé publique et en agriculture dans le pays [9, 19]. Ces résultats traduisent donc l'efficacité de ces insecticides qui peuvent être utilisés pour les Pulvérisations Intra-Domiciliaires (PID) dans la zone d'Oyem [9]. où la résistance aux Pyréthriinoïdes a été mise en évidence. Dans le cadre de la gestion de la résistance au Bénin, Akogbéto *et al.* [38] ont rapporté que le Bendiocarbe a montré son efficacité quand il a été utilisé dans les PID.

Toutefois, des études complémentaires sont judicieuses afin de mieux apprécier la dynamique spatio-temporelle de la sensibilité des populations d'anophèles aux insecticides usuels.

5 CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier les espèces du complexe *An. gambiae* et les profils de sensibilité de ce vecteur majeur du paludisme dans la zone d'Oyem. Globalement, les anophèles des sites prospectés sont des *Anopheles gambiae*. Ces vecteurs ont déjà développé des résistances au DDT et aux Pyréthriinoïdes dues aux mutations Kdr-West et Kdr-East. Cela pourrait menacer l'usage des MILDA imprégnées aux Pyréthriinoïdes.

Fort heureusement, ces anophèles restent toujours sensibles aux Carbamates et aux Organophosphorés qui pourraient servir d'alternatives en cas de très forte résistance des moustiques d'Oyem aux Pyréthriinoïdes.

Pour garantir l'efficacité des MILDA dans la lutte antipaludique à Oyem et dans d'autres localités, il serait bien de préserver les pyréthriinoïdes pour l'imprégnation des moustiquaires et réduire leur utilisation dans les autres secteurs d'activités. De même, une surveillance de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et la caractérisation de tous les mécanismes de résistance impliqués sont essentielles afin de concevoir des stratégies de lutte efficaces et adaptées à la zone d'étude. Enfin, les données de cette étude fournies des informations qui pourraient aider le Programme National de lutte contre le Paludisme dans le cadre de la gestion durable de la résistance ou la conception des stratégies de lutte antivectorielle à Oyem.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier, institutionnel et logistique du Laboratoire d'Ecologie Vectorielle (LEV), de l'Institut de Recherche en Ecologie Tropicale (IRET), de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Et nous remercions Pr LASSANA KONATE, Dr Ghislain EBANG ELLA, Léo SIMA OWONO, Khady SYLLA et Gnima BODIAN pour leur aide multiforme.

REFERENCES

- [1] J Mouchet, P Carnevale, M Coosemans, J Julvez, S Manguin, D Richard-Lenoble, J Surcoulon (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. 22p.
- [2] OMS (2021). Rapport Mondial sur le Paludisme dans le monde. Dossier d'information. Principaux messages. 3p.
- [3] WHO (2022). World malaria report. World Health Organization, Geneva, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 372p.
- [4] ALMA (2021). Carte de Score pour la Redevabilité et l'Action: Gabon. Rapport trimestriel de l'ALMA 4^{ème} Trimestre 2021. African Leaders Malaria Alliance (Alliance des Dirigeants Africains contre le Paludisme), Malawi, 4p.

- [5] J.B Lendongo-Wombo, S.L Oyegue-Liabagui, J.C Biteghe-Bi-Essone, E.B Ngoungou & J.B Lekana-Douki (2022). Epidemiology of malaria from 2019 to 2021 in the southeastern city of Franceville, Gabon. *BMC Public Health*, 22: 2313.
- [6] J.B Lendongo Wombo, E Ibinga, S.L Oyegue-Liabagui, R.K Imboumy Limoukou, A.P Okouga, F Mounioko, S Maghendji-Nzondo, J.B Lekana-Douki & E.B Ngoungou (2023). Severe malaria in children and adolescents in Southeast Gabon. *BMC Infectious Diseases*, 23: 207.
- [7] J Delmont, E Pichard, S Jauréguiberry, B Marchou, P Parola, F Simon *et al.* (2016). *Maladies infectieuses tropicales*. Alliéna Plus.
- [8] A.A Koumba, C.R Zinga Koumba, R Mintsas Nguema, L.S Djogbenou, P Comlan, MP Gneingui, GK Ketoh, B M'batchi, & JF Mavoungou, (2018b). *Détermination de la sensibilité d'Anopheles gambiae s.l. à quelques pyréthrinoïdes dans les zones élaéicoles à Mouila (Gabon)*. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 39 (2), 110-119.
- [9] A.A Koumba, C.R Zinga Koumba, R Mintsas Nguema., P Obame Ondo., G Bibang Bengono, P Comlan, G.K Ketoh, L.S Djogbenou, O Faye, B M'batchi, & JF Mavoungou., (2018a). *Susceptibilité d'Anopheles gambiae s.s. et An. coluzzii aux organophosphorés et aux carbamates en zones d'exploitation industrielle de palmiers à huile à Mouila, Gabon*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 111, 176-182.
- [10] G Duvallet, D Fontenille & V Robert (2017). *Entomologie médicale et vétérinaire*. IRD Editions, Editions Quae, Marseille, Versailles, 688p.
- [11] C Kerah-Hinzoumbe, M Peka. P Nwane, I Donan-Gouni, J Etang, A Samè-Ekobo And Simard F (2008) «Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from south-western Chad, Central Africa», *Malaria Journal*, vol. 7, pp. 192-201.
- [12] J. L. Moreno, J. Vicente, P Cano, J Berzosa, A De Lucio, S Nzambo, L Bobuakasi, J.N Buatiche, M Ondo, F Micha, V.E Do Rosario, J Pinto, A Benito (2008) «Knockdown resistance mutations (kdr) and insecticide susceptibility to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* from Equatorial Guinea», *Trop. Med. Int. Health.*, vol. 13, n°3, pp. 430-3.
- [13] C Antonio-Nkondjio, B T Fossog, E Kopya, Y Poumachu, B M., Djantio, C Ndo et al. (2015). Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malaria journal* 14: 155.
- [14] G.K Metelo, G. M. Ilombe, Binene, J Nguya Kalemba Maniania, Muyembe, J.J Nagahuedi., «Profil de la sensibilité et mécanisme de résistance des *Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides et PBO dans 3 sites de la province de Bandundu en République Démocratique du Congo», *Ann. Afr. Med.*, vol. 9, n°1, pp. 2193-2200, 2015.
- [15] J. R Mourou, T Coffinet, F Jarjaval, B Pradines, R Amalvict, C Rogier, M Kombila, & F Pages (2010). *Malaria transmission and insecticide resistance of Anopheles gambiae in Libreville and Port-Gentil, Gabon*. *Malaria Journal*, 9 (32), 1-8.
- [16] A.A Koumba, C.R Zinga-Koumba, R Mintsas-Nguema, S.L Sevidzem, L.S Djogbenou, P.N Akono, G.K Ketoh, O Faye, B M'batchi and JF Mavoungou (2018c). Identification of the knockdown resistance (Kdr) mutations in *Anopheles gambiae s.l.* in the Mouila area, Southwest Gabon. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6 (3): 602-607.
- [17] S.T Boussougou-Sambe., T.G Tamirat Gebru Woldearegai., A.G Doumba-Ndalembouly., B Ngossanga, R Beh Mba, J. R Edoa., J. F Zinsou, Y.J, Honkpehedji U Ateba Ngoa, J.C Dejon-Agobé, P.G Borrmann Kremsner, B Mordmüller. & A.A Adegnika (2022). Assessment of malaria transmission intensity and insecticide resistance mechanisms in three rural areas of the Moyen Ogooué Province of Gabon. *Parasites & vectors*, 15: 217.
- [18] PNUD (Programme des Nations Unies pour le développement) (2009). Programme ART GOLD GABON, Document de Marketing-Province du Woleu-Ntem, 60p.
- [19] K P Obame Ondo, C R Zinga-Koumba, A A Koumba, Lendzele Sevidzem, J.F Mavoungou, O Faye (2021). Typologie des gîtes larvaires et sensibilité d'*Anopheles gambiae s.l.* Aux Insecticides En Zone Urbaine, Peri-Urbaine Et Rurale A Oyem (Nord Du Gabon). *ESJ Natural/Life/Medical Sciences*. Doi: 10.19044/esj.2022.v18n17p22.
- [20] N Nasr, B Delpech, N Flitner, M Hulshof, J. C Torrelles, & F Twagirangungu (1995). *Quelle agriculture vivrière pour le nord du Gabon?* Agriculture et développement, N.8.
- [21] B Papierok, H Croset & J.A Rioux (1975). Estimation de l'effectif des populations larvaires d'*Aedes cataphylla* Dyar, 1916 (Diptera, Culicidae) II: Méthode utilisant le coup de louche ou dipping. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 13 (1): 47-51.
- [22] C.M Egbuche, C.K Ezihe, D.N Aribodor, & C.B Ukonze (2016). Survey of mosquitoes in open and closed larval habitats in Aguleri, Anambra East Local Government Area of Anambra State, South Eastern Nigeria. *Journal of Mosquito Research*, 6 (17), 1-5.
- [23] F Baldacchino & C Paupy (2010). Clé de détermination des Culicidae présents en Afrique Centrale et au Gabon. Document de travail, IRD/CIRMF, 108p.
- [24] M. Coetzee (2020). *Key to the females of Afrotropical Anopheles mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. *Malaria Journal*, 19, 70, <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3144-9>. Licence CC BY 4.0.
- [25] OMS (2017). Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme, Seconde édition. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 48p.

- [26] E Wilkins Elein, L Howell Paul, Q Benedict Mark (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*. *Malar J* 5: 125.
- [27] L.Y Huynh, S.R Sandve, L.M Hannan, M Van Ert, J.E Gimnig (2007) Fitness costs of pyrethroid insecticide resistance in *Anopheles gambiae*. In: Annual Meeting of the Society for the Study of Evolution, Christchurch, New Zealand.
- [28] C Weill M, Malcolm, F Chandre, K Mogensen, A Berthomieu, M Marquine, M Raymond (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13: 1-7.
- [29] J Etang, & F Simard (2002). Résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides. In: Résistance des insectes aux insecticides en Afrique de l'ouest et du centre. Actes de l'atelier, 06- 07 mars 2002, Maroua, Cameroun: Volume 1: résumés et recommandations, Volume 2: communications et présentations, Brévault Thierry (ed.), Nibouche Samuel (ed.), CIRAD, PRASAC, IRAD.
- [30] A Mbida Mbida, J Etang, P Akono Ntonga, C Eboumbou Moukoko, P Awono-Ambene, D Tagne, *et al.* (2017). New insight into *Anopheles coluzzii* larval ecology in the Wouri estuary, Littoral- Cameroon (in French). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 110: 92-101.
- [31] P Carnevali, & V Robert (2009). Les anophèles: biologie, transmission du plasmodium et lutte antivectorielle. Didactiques, Marseille.
- [32] J.P Adam (1964). Répartition géographique des anophèles en République du Congo (Brazzaville). *Cahiers ORSTOM Série Entomologie Médicale Parasitologie*, 2: 73–82.
- [33] Akono Ntonga P, Mbida Mbida, A, Awono Ambene P, Youmbi Enga L, Kayoum Y A, & Kekeunou S. (2018). Habitats larvaires et sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides dans des localités (semi-urbaine et rurale) de la région du littoral camerounais: Données préliminaires. *Revue d'Ecologie (Terre Vie)*, 73 (2), 132-141.
- [34] C Czeher, R Labbo, I Arzika, & J Duchemin,. (2008). Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticidetreated nets implementation. *Malaria Journal*, 12, 1–12.
- [35] V Corbel, M Akogbeto, G. B Damien, A Djenontin, F Chandre, C Rogier, N Moiroux, J Chabi, B Banganna, G.G Padonou & M Henry. (2012). Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 12 (8), 617–626.
- [36] C Kamdem, B Tene Fossog, F Simard, J Etouna, C Ndo, P Kengne, F.X Etoa, P Awono-Ambene, D Fontenille, C Antonio-Nkondjio, N.J Besansky, C Costantini (2012). Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*, *PLoS One*, vol. 7, n°6, e39453.
- [37] C Antonio-Nkondjio, N Sonhafouo-Chiana, C.S Ngadjeu, P Doumbe-Belisse, A Talipouo, L Djamouko-Djonkam, E Kopya, R Bamou, P Awono-Ambene And. C.S Wondji (2017). «Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017». *Parasites & Vectors*, vol. 10, pp. 472-487.
- [38] M.C Akogbéto, G.G Padonou, D Gbénou, S Irish & A Yadouleton (2010) Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malaria journal* 9: 204.