

Détermination de la sensibilité des *Anopheles gambiae s.l.* à quelques pyréthrinoïdes dans les zones élaéicoles à Mouila (Gabon)

[Détermination of the susceptibility of *Anopheles gambiae s.l.* to some pyrethroids in the oil palm exploitation areas at Mouila (Gabon)]

Aubin Armel KOUMBA¹⁻²⁻³, Christophe Roland ZINGA KOUMBA¹, Rodrigue MINTSA NGUEMA¹, Luc Salako DJOGBENOU²⁻³, Pearl COMLAN⁴, Marie-Pascale GNEINGUI⁵, Guillaume Koffivi KETOH⁶, Bertrand M'BATCHI⁷, and Jacques François MAVOUNGOU¹⁻⁷

¹Institut de Recherche en Ecologie Tropicale (IRET), BP : 13354, Libreville, Gabon

²Université d'Abomey-Calavi (UAC), 05 BP : 1604, Cotonou, Benin

³Institut Régional de Santé Publique (IRSP), BP : 918, Ouidah, Benin

⁴Université des Sciences de la Santé (USS), BP : 4009, Libreville, Gabon

⁵Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), BP : 14426, Libreville, Gabon

⁶Unité de Recherche en Ecotoxicologie, Université de Lomé (UL), BP : 1515, Lomé, Togo

⁷Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM), BP : 941, Franceville, Gabon

Copyright © 2018 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 objective of this study was to evaluate the susceptibility of malaria vectors to pyrethroids and to detect the presence of *kdr* mutations in two peripheral agricultural sites in the city of Mouila. The study was conducted during the rainy season in 2017. *Anopheles* were collected at the larval stage by the "dipping" method and reared in the laboratory until the adult stage. Susceptibility tests were performed on the F0 generations according to the protocol recommended by WHO. The insecticides used were alphacypermethrin (0.05%, 0.25%, 0.50%), cyfluthrin (0.15%, 0.75%), etofenprox (0.5%, 5%) and bifenthrin 0.20%. The individuals of *Anopheles gambiae s.l.* from the tests were identified by the PCR technique. The survivor and dead mosquitoes were used to detect *kdr* mutations via PCR. The members of the *An. gambiae* complex of the study sites were composed of two species, *An. gambiae s.s.* and *An. coluzzii*, with a predominance of *An. gambiae s.s.* The test results showed a resistance to alphacypermethrin (0.05%, 0.25% and 0.50%), cyfluthrin 0.15%, etofenprox 0.5% and bifenthrin 0.20% in both study sites and a suspicion of resistance to etofenprox 2.5% in the Moutassou site. Populations of *An. gambiae s.l.* were susceptible to cyfluthrin 0.75% in these study sites ($\leq 98\%$) and etofenprox 2.5% in the Mboukou site (100%). These two insecticides could be used for vector control after resistance has been observed to permethrin and deltamethrin (at low doses).

KEYWORDS: Vectors, Malaria, Resistance, Sensitivity, Pyrethroids, Mouila, Gabon.

RESUME: L'objectif de cette étude était d'évaluer la sensibilité des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes et de détecter la présence des mutations *Kdr* dans deux sites d'exploitations agricoles périphériques à la ville de Mouila. L'étude a été menée pendant la saison des pluies 2017. Les anophèles ont été collectés au stade larvaire par la méthode du « *dipping* » et élevés au laboratoire jusqu'au stade adulte. Des tests de sensibilité ont été réalisés sur les générations F0 suivant le protocole

recommandé par l'OMS. Les insecticides utilisés étaient : l'alphacyperméthrine (0,05%, 0,25%, 0,50%), la cyfluthrine (0,15%, 0,75%), l'etofenprox (0,5%, 2,5%) puis la bifenthrine 0,20%. Les individus d'*Anopheles gambiae s.l.* provenant des tests ont été identifiés par la technique PCR. Les survivants aux tests et les morts ont été utilisés pour la détection des mutations Kdr via la PCR. Les membres du complexe *An. gambiae* des sites étudiés étaient composés de deux espèces, *An. gambiae s.s* et *An. coluzzii*, avec une prédominance d'*An. gambiae s.s*. Les résultats des tests ont montré une résistance à l'alphacyperméthrine (0,05%, 0,25% et 0,50%), la cyfluthrine 0,15%, l'etofenprox 0,5% et la bifenthrine 0,20% dans les deux sites étudiés et une suspicion de résistance à l'etofenprox 2,5% dans le site de Moutassou. Les populations d'*Anopheles gambiae s.l.* étaient sensibles à la cyfluthrine 0,75% dans ces sites étudiés ($\leq 98\%$) et à l'etofenprox 2,5% dans le site de Mboukou (100%). Ces deux insecticides pourraient être utilisés pour la lutte antivectorielle après qu'une résistance ait été observée à la perméthrine et à la deltaméthrine (aux faibles doses).

MOTS-CLEFS: Vecteurs, Paludisme, Résistance, Sensibilité, Pyréthrinoïdes, Mouila, Gabon.

1 INTRODUCTION

La connaissance de la sensibilité des moustiques du complexe *Anopheles gambiae* vis-à-vis des insecticides recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est un préalable important pour développer les stratégies intégrées de la lutte contre les maladies transmises par ces insectes [1]. En effet, plusieurs espèces de ce complexe dont *Anopheles gambiae s.s* et *Anopheles coluzzii* sont impliquées dans la transmission des plasmodiums responsables du paludisme. Cette parasitose constitue la maladie infectieuse à transmission vectorielle la plus répandue dans le monde [2, 3, 4, 5]. Les estimations concernant la problématique du paludisme dans le monde indique une augmentation du nombre de cas de paludisme qui est passé entre 2015-2016, de 211 à 216 millions, soit un taux d'augmentation de 2,37% [6]. Par ailleurs, le nombre de décès dus à cette maladie a augmenté de 438 000 à 445 000 morts en un an [1]. Cette augmentation des cas de paludisme et des décès associés a été la plus significative dans la région Afrique, qui concentre 90 % des cas de paludisme et des décès associés dans le monde. Quinze pays, tous en Afrique subsaharienne sauf un, représentent 80 % du fardeau du paludisme au niveau mondial [6].

Le Gabon, à l'instar des autres pays africains, paie le lourd tribut de la prévalence palustre. En effet, le paludisme y est l'un des problèmes majeurs de santé publique de par ses taux de mortalité infantile et d'hospitalisations élevés [7]. Des formes graves surviennent chez 45% des enfants fébriles hospitalisés et chez 71% des femmes enceintes [8]. La transmission de cette parasitose y est principalement assurée par les membres des complexes *An. gambiae* et *An. funestus* [9, 10, 11]. Pour lutter contre le paludisme, le Gabon a adopté différentes stratégies de lutte axées sur la prévention (Moustiquaires Imprégnées d'insecticides à Longue Durée d'Efficacité MILDE et Traitement Préventif Intermittent TPI) et la prise en charge des cas via le diagnostic de la maladie (Test de Diagnostic Rapide TDR et microscopie) et le traitement (Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine CTA).

La prévention en se basant sur le contrôle des vecteurs est l'une des approches efficaces pour diminuer l'incidence du paludisme dans les zones d'endémie. Mais cette lutte se heurte à des problèmes tels que l'émergence de la résistance des moustiques aux insecticides habituels [11, 12, 13, 14]. Des études ont rapporté que les populations d'*Anopheles gambiae s.l.* capturées à Libreville et à Port-Gentil, étaient résistantes au DDT et aux pyréthrinoïdes [11, 15]. Ce phénomène de résistance aux insecticides est mal connu dans les autres zones écologiques du Gabon. Pourtant, certaines de ces zones telles que Mouila, abritent des sites de palmier à huile propices au développement des moustiques [16]. C'est dans ce contexte qu'une étude sur la sensibilité des populations d'*Anopheles gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes a été conduite dans les espaces agricoles de Mouila (sud-ouest du Gabon).

L'objectif de cette étude était de déterminer le niveau de sensibilité des espèces anophéliennes du complexe *An. gambiae* présentes dans la zone d'étude afin de cribler les insecticides et les doses appropriées pour organiser à la fois la lutte antivectorielle et la gestion de la résistance des anophèles aux insecticides.

2 METHODOLOGIE

2.1 ZONE D'ETUDE

Cette étude a été conduite en saison des pluies 2017 dans deux sites d'exploitation du palmier à l'huile à Mouila : Moutassou et Mboukou (fig. 1). Ces sites sont situés à la périphérie de la ville de Mouila (sud-ouest du Gabon), à 420,6 kilomètre de Libreville.

Le site de Mboukou est une zone de palmeraies qui se trouve dans le département de Tsamba-Magotsi (1°39'06" Sud et 10°49'42,6" Est) à environ 35 kilomètres de la ville de Mouila. Ce site industriel couvre environ 35 000 hectares [17]. Quant au site de Moutassou, il se trouve dans le département de la Douya-Onoye (1°59'33,8" Sud et 11°02'25,2" Est) à environ 13 kilomètres de la ville de Mouila. Ce site agro-industriel s'étend sur près de 24 000 hectares.

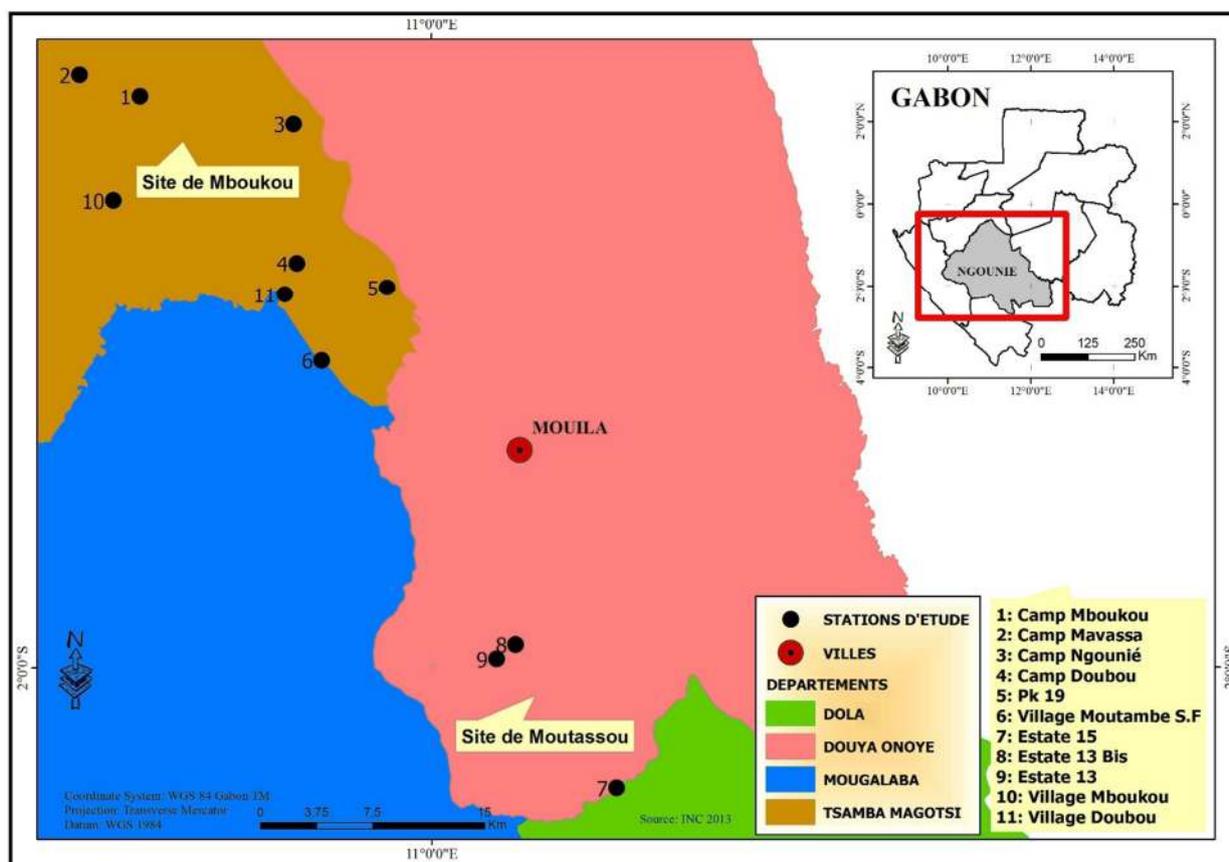


Fig. 1. Localisation géographique des sites d'étude et des stations de prélèvement

2.2 COLLECTE ET TRAITEMENT DES MOUSTIQUES

Les populations d'anophèles destinés aux tests de sensibilité aux insecticides ont été collectés à l'état larvaire dans les gîtes naturels (flaques, mares, étangs) et artificiels (retenues d'eau, fosses, empreintes de pneu) présents dans 11 stations prélèvement réparties dans la zone d'étude. Ces stations étaient représentées par le Pk19, le camp Moutassou (Estate 13, Estate 13Bis, Estate 15), le village Moutambe Sane Foumou, le camp Doubou, le village Mboukou, le village Doubou, le camp Mavassa, le camp Ngounié, le camp Mboukou. La collecte des larves et des nymphes d'anophèles a été faite dans les gîtes positifs [18] suivant la méthode de « dipping » [19].

Les larves et les nymphes d'anophèles ont été transférées dans les plateaux à l'aide des pipettes de transfert puis transportées au laboratoire pour leur élevage [20]. Ces larves étaient élevées dans de l'eau provenant des gîtes et nourries tous les deux jours avec la farine pour poissons d'ornement (Sera Vipagran) [21].

Les adultes obtenus ont été nourris *ad libitum* à l'aide d'une solution sucrée à 8% mise sur du coton. Ils ont été identifiés morphologiquement à l'aide de la clé d'identification de [22] et les femelles ont été soumises aux tests de sensibilité.

2.3 TESTS DE SENSIBILITÉ AUX INSECTICIDES

Les tests de sensibilité aux insecticides ont été effectués sur des femelles adultes nourries, non gorgées, âgées de 2 à 4 jours, issues des larves prélevées dans les différents gîtes larvaires des sites d'étude. Les tests ont été réalisés selon le protocole standardisé de l'OMS [23]. En effet, des lots de 25 moustiques femelles ont été exposés aux papiers imprégnés à différents insecticides dans les tubes pendant 60 minutes. Dans le tube témoin, les moustiques ont été exposés à un papier non traité à l'insecticide mais imprégné d'huile d'olive (tableau 1).

Tableau 1. Insecticides utilisés pour les tests de sensibilité

Classe	Insecticides	Concentration diagnostique (%)
Pyréthroïdes	Alphacyperméthrine	0,05 - 0,25 - 0,50
	Cyfluthrine	0,15 - 0,75
	Etofenprox	0,5 - 2,5
	Bifenthrine	0,20

Les effets knock-down ont été d'abord relevés chaque 5 minutes pendant les 20 premières minutes d'exposition puis toutes 10 minutes jusqu'à ce qu'on a ce que l'on atteint 60 minutes d'exposition. En parallèle, le nombre de moustiques morts dans le lot témoin a été enregistré. Au bout d'une heure d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes d'observation contenant des papiers non traités (imprégnés d'huile d'olive) et nourris avec une solution sucrée à 8%. La mortalité post-exposition a été relevée pour chaque lot après 24 heures. Par ailleurs, tous les papiers imprégnés d'insecticide ont été pré-testés avec les adultes de la souche sensible de référence Kisumu afin de confirmer leur efficacité sur la souche sensible [24]. Les tests de sensibilité ont été effectués dans des conditions de laboratoire suivantes : 26-29°C et 74-82% d'humidité relative.

Après les tests, tous les *Anopheles gambiae* testés (morts et survivants) provenant de chaque site, ont été conservés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant du silicagel. Ces anophèles ont été ensuite conditionnés de façon séparée par lot : les morts formaient un lot et les survivants un autre. Ces deux lots des spécimens ont servi pour l'identification moléculaire des espèces de moustiques et la détermination des mutations Kdr [3, 24, 25].

2.4 IDENTIFICATION DES ESPÈCES DU COMPLEXE ANOPHÈLES GAMBIAE PAR PCR

Après les tests de sensibilité aux insecticides, les moustiques survivants, après 24 heures d'observation pour chaque insecticide et une partie des moustiques morts ont été identifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en espèces. Ainsi, l'ADN total des moustiques a été extrait selon la méthode de [26] et dilué au 1/15 dans de l'eau stérile. L'identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* a été réalisée grâce à la technique de [27]. Ce test de diagnostic par PCR Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) consiste à amplifier un fragment d'ADN d'environ 1 500 paires de bases (pb) à l'aide de deux oligonucléotides (A.O et A1.3). Cette séquence a été ensuite digérée par une enzyme de restriction Hin61 ou Tru9 permettant d'identifier les formes moléculaires M et S dorénavant appelées respectivement *An. coluzzii* et *An. gambiae s.s.*

2.5 RECHERCHE DES MUTATIONS KDR PAR PCR

La détection des mutations Kdr-west et Kdr-east a été faite suivant les protocoles développés par [28] et [29]. Aussi, le test diagnostic PCR-Polymerase of Allelic Specific Amplification (PCR-PASA) a consisté à utiliser quatre oligonucléotides ou primers dénommés Agd1 (5'-ATAGATCCCGACCATG-3'), Agd2 (5'-AGACAAGGATGATGAACC-3'), Agd3 (5'-AATTTGCATTACTTACGACA-3'), Agd4 (5'-CTGTAGTGATAGGAAATTTA-3') et la Taq polymérase pour rechercher par amplification les allèles résistants ou sensibles sur un fragment d'ADN codant pour « le canal sodium voltage dépendant » chez chaque moustique testé. Ce test a donc permis de définir les génotypes homozygotes résistants (RR), homozygotes sensibles (SS) et hétérozygotes (RS). La détermination de la fréquence de la mutation Kdr selon les sites étudiés a été réalisée grâce au logiciel « génépop 2.0 » [30].

2.6 ANALYSES DES DONNÉES

Elles ont consisté à déterminer les Tkd50 et Tkd95 (Temps de knock-down) désignant respectivement le temps nécessaire pour que 50% et 95% des moustiques soient assommés après 1 heure de contact avec un insecticide et, les taux de mortalité observés après 24 heures. Ces Tkd ont été estimés à partir de la fonction probit tandis que les taux de mortalité ont été calculés en divisant le nombre de moustiques tués par le nombre total de moustiques testés pour chaque insecticide. Les résultats des tests de sensibilité ont été interprétés selon les critères définis par l'OMS [23]. La formule d'Abbott sert à corriger la mortalité observée dans les tests de susceptibilité des adultes lorsque la mortalité dans le lot témoin est comprise entre 5 % et 20 % [31].

3 RÉSULTATS

3.1 MORTALITÉ DANS LES SITES D'ÉTUDE

Un total de 1600 femelles d'*An. gambiae s.l.* (800 à Mboukou et 800 à Moutassou) âgées de 2-4 jours ont été soumis aux tests de sensibilité aux insecticides. Dans tous les tests réalisés, la mortalité dans les lots témoins a été toujours inférieure à 5 %. Il n'a pas été nécessaire de corriger les taux de mortalité dans les lots testés (tableaux 2 et 3). Les tests ont montré globalement une sensibilité des populations d'*An. gambiae s.l.* à la cyfluthrine 0,75% dans tous les sites d'étude (100% de taux de mortalité). A part le site Mboukou où les anophèles étaient sensibles à l'etofenprox 2,5% (100%), une suspicion de résistance à cet insecticide a été observée dans le site de Moutassou (92%). Par ailleurs, une résistance d'*Anopheles gambiae s.l.* à l'alphacyperméthrine (0,05%, 0,25% et 0,50%), à la cyfluthrine 0,15%, à la bifenthrine 0,20% et à l'etofenprox 0,5% a été signalée dans les deux sites étudiés avec des mortalités comprises entre 12 et 86%.

Tableau 2. Mortalité des *An. gambiae s.l.* après 24 h d'observation à Mboukou

Site	Insecticide testé	Nombre exposé	Mortalité (%)	Statut
Mboukou	Alphacyperméthrine 0,05%	100	48	Résistant
	Alphacyperméthrine 0,25%	100	86	Résistant
	Alphacyperméthrine 0,50%	100	78	Résistant
	Cyfluthrine 0,15%	100	48	Résistant
	Cyfluthrine 0,75%	100	100	Sensible
	Etofenprox 0,5%	100	10	Résistant
	Etofenprox 2,5%	100	100	Sensible
	Bifenthrine 0,20%	100	12	Résistant

Tableau 3. Mortalité des *An. gambiae s.l.* après 24 h d'observation à Moutassou

Site d'étude	Insecticides testés	Nombre exposé	Mortalité (%)	Statut
Moutassou	Alphacyperméthrine 0,05%	100	70	Résistant
	Alphacyperméthrine 0,25%	100	86	Résistant
	Alphacyperméthrine 0,50%	100	78	Résistant
	Cyfluthrine 0,15%	100	58	Résistant
	Cyfluthrine 0,75%	100	98	Sensible
	Etofenprox 0,5%	100	24	Résistant
	Etofenprox 2,5%	100	92	Résistant probable
	Bifenthrine 0,20%	100	66	Résistant

3.2 TEMPS DE KNOCK-DOWN DANS LES SITES D'ÉTUDE

En présence de l'alphacyperméthrine 0,05%, l'alphacyperméthrine 0,5% et la bifenthrine 0,2%, les TKd95 sont restés supérieurs à 60 minutes pour les femelles adultes d'*An. gambiae s.l.* (souches Mboukou et Moutassou). Par contre, pour la cyfluthrine 0,15%, l'alphacyperméthrine 0,25%, l'etofenprox 0,5% et l'etofenprox 2,5%, les Tkd95 ont été supérieurs à 60 mn chez les anophèles de Moutassou. A part les « No kd » signalés chez les spécimens de Mboukou exposés à la cyfluthrine 0,15%

et à l'etofenprox 0,5%, les Tkd95 ont été supérieurs à 60 minutes chez ces anophèles quand ils ont été soumis à la cyfluthrine 0,75%. Cependant, les Tkd95 sont restés inférieurs à 52 minutes en présence de l'alphacyperméthrine 0,25% chez *An. gambiae* s.l. provenant de Mboukou et inférieurs à 51 minutes en présence de la cyfluthrine 0,75% pour les femelles adultes d'*An. gambiae* s.l. provenant de Moutassou.

S'agissant des Tkd50, ils ont été les plus faibles en présence de l'alphacyperméthrine 0,5% (17,56 min chez les anophèles de Moutassou et 20,81 min chez ceux de Mboukou), de l'alphacyperméthrine 0,25% (25,21 min chez les anophèles de Moutassou et 26,05 min chez ceux de Mboukou) et de l'etofenprox 2,5% (37,31 min chez les anophèles de Moutassou et 30,68 min chez ceux de Mboukou). Par contre, les Tkd50 sont restés très et supérieurs à 60 minutes en présence de l'etofenprox 0,5% (71,4 min) et de la bifenthrine 0,2% (89,23 min chez les moustiques de Moutassou et 115,06 min chez ceux de Mboukou).

Tableau 4. Temps de knock-down au bout de 60 minutes d'exposition des *An. gambiae* s.l. à l'insecticide (IC à 95%).

Insecticides	Mboukou		Moutassou	
	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)
Alphacyperméthrine 0,05%	54,65 (47,88– 66,15)	92,51 (77,38– 123,93)	42,17 (34,82– 52,9)	76 (62,08– 109,24)
Alphacyperméthrine 0,25%	26,05 (19,97– 32,36)	51,02 (42,28– 69,11)	25,21 (16,59– 33,11)	62,39 (49,74– 92,72)
Alphacyperméthrine 0,5%	20,81 (13,83– 28,97)	94,68 (56,51– 348,01)	17,56 (11,62– 23,75)	73,04 (46,81– 201,1)
Cyfluthrine 0,15%	No Kd	No Kd	51,12 (46,66– 57,16)	80,71 (71,45– 96,34)
Cyfluthrine 0,75%	45,78 (42,49– 49,59)	70,13 (63,98– 79,41)	21,84 (7,55– 33,27)	50,14 (37,18– 101,2)
Etofenprox 0,5%	No Kd	No Kd	71,4 (56,83– 109,57)	151,7 (112,2– 264,2)
Etofenprox 2,5%	30,68 (21,56– 40,93)	59,86 (47,4– 93,49)	37,31 (29,59– 47,37)	70,16 (56,9– 102,42)
Bifenthrine 0,2%	115,06 (84,9– 254,2)	115,06 (127,02– 451,7)	89,23 (73,57– 135,16)	135,3 (104,7– 228,8)

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% ; Tkd50 et Tkd95 : Temps de Knock-down ou temps nécessaire pour que 50% et 95% des moustiques soient assommés après 1 heure de contact avec un insecticide.

3.3 COMPOSITION MOLÉCULAIRE D'ANOPHELES GAMBIAE SENSU LATO

L'identification des espèces d'*An. gambiae* s.l. a été réalisée par le technique PCR. Elle a révélé la présence de deux espèces anophéliennes : *An. gambiae* s.s. (anciennement appelée forme moléculaire S) et *An. coluzzii* (anciennement appelée forme moléculaire M), avec une prédominance d'*An. gambiae* s.s (99,14 %) par rapport à *An. coluzzii* (0,86 %).

3.4 MUTATIONS KDR (KNOCK-DOWN RESISTANCE)

La recherche des mutations Kdr-west et kdr-east a été faite par PCR. Les résultats de cette PCR ont montré la présence des mutations kdr chez les populations naturelles d'*An. gambiae* s.l. des sites de Mboukou et de Moutassou (tableau 5). Les individus homozygotes résistants (RR) avaient une forte fréquence. En effet, dans les sites étudiés, la coexistence des gènes de résistance kdr-w et kdr-e a été observée mais une prédominance du gène kdr-w (FR = 0,99) sur le gène kdr-e (FR = 0,28). La fréquence du gène kdr-w était plus élevée à Moutassou (FR = 1) qu'à Mboukou (0,99). Par contre, la fréquence du gène kdr-e était plus forte à Mboukou (FR = 0,21) qu'au niveau de Moutassou (FR = 0,14).

Tableau 5. Fréquence des gènes de résistance kdr exprimés dans les échantillons identifiés

Site de collecte	N	Espèce		Kdr West (1014F)				Kdr Est (1014S)			
		<i>An. gambiae</i> s.s	<i>An. coluzzii</i>	RR	RS	SS	F (R)	RR	RS	SS	F (R)
Mboukou	182	180	2	179	3	0	0,99	30	17	135	0,21
Moutassou	52	52	0	52	0	0	1	3	9	40	0,14
Total	234	232	2	231	3	0	0,99	33	26	175	0,28

RR = individus homozygotes résistants, RS = individus hétérozygotes et SS = individus homozygotes sensibles ; F(R) = Fréquence de l'allèle résistant = $[nRS + 2x(nRR)]/2N$.

4 DISCUSSION

Les analyses moléculaires ont révélé la présence dans les sites d'étude d'*An. coluzzii* et *An. gambiae s.s.* qui sont connues comme des vecteurs majeurs du paludisme au Gabon [11, 32]. Ces deux espèces anophéliennes sont les seuls membres du complexe *An. gambiae* dans les sites d'étude avec une forte abondance d'*An. gambiae s.s.* Ces résultats sont similaires à ceux des études précédentes conduites par [11] et [32] qui ont montré une prédominance d'*An. gambiae s.s.* dans les échantillons collectés à Libreville et Port-Gentil. L'abondance de l'espèce *An. gambiae s.s.* dans nos résultats pourrait être liée à la nature des gîtes de développement et à la saison climatique [33, 34]. En effet, les conditions d'insalubrités observées dans les stations de collecte semblent propices à *An. gambiae s.s.* contrairement à *An. coluzzii*. Des études antérieures ont montré qu'*An. gambiae s.s.* est plus fréquente dans les gîtes plus éphémères et dépendants des pluies [33, 35] tandis qu'*An. coluzzii* abondent souvent dans les collections d'eau permanentes et sémi-permanentes relativement propres (non pollués) [30]. Cette prédominance d'*An. gambiae s.s.* sur les autres membres du complexe *An. gambiae* est conforme aux études antérieures [11, 32] qui ont montré la présence prépondérante de cette espèce à Libreville (> 90%).

Notre étude a mis en évidence une résistance d'*An. gambiae s.l.* à alphacyperméthrine (0,05%, 0,25%, 0,50%), à la cyfluthrine 0,15%, à l'etofenprox 0,5% et à la bifenthrine 0,20% qui sont des insecticides non encore utilisés en santé humaine au Gabon. Cette situation pourrait constituer une limite dans la lutte antipaludique dans cette zone d'étude puisque la résistance des vecteurs d'agents pathogènes aux insecticides affecte à la fois l'économie et la santé publique [36]. La baisse d'efficacité des pyréthrinoïdes vis-à-vis d'*An. gambiae s.l.* a déjà été rapportée dans les pays voisins tels qu'au Cameroun [37, 38], au Tchad [39], en Guinée Equatoriale [14], en République Démocratique du Congo [40]. Cette résistance d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes a été aussi observée par [41], puis [18] et [30], respectivement à Tiassaléko dans le village de riziculture irriguée en zone sud forestière en Côte d'Ivoire et dans cinq sites agricoles en Côte d'Ivoire. Ces auteurs ont montré que les populations d'*An. gambiae s.l.* de ces zones ont été résistants aux insecticides de la famille des pyréthrinoïdes. Ces mêmes observations ont été faites par [42] dans la partie sud du Bénin, dans les régions urbaines et de cultures des légumes où les populations d'*An. gambiae s.l.* ont été résistantes à la lambda-cyhalothrine 0,05%, insecticide de la famille des pyréthrinoïdes. En Centrafrique, [43] a montré que les populations d'*An. gambiae s.l.* de Bangui, sont aussi résistants à la lambda-cyhalothrine 0,05%.

Aussi, cette résistance aux pyréthrinoïdes testés suppose l'existence d'une pression de sélection dans les sites étudiés. Ce fait pourrait être lié à l'utilisation massive des pyréthrinoïdes pour la lutte contre les ravageurs des palmiers à huile et leur usage domestique contre les moustiques nuisibles et vecteurs de paludisme (moustiquaires imprégnées d'insecticides, sprays) dans les sites étudiés. Ces observations ont été aussi faites dans d'autres pays africains, notamment au Bénin, au Cameroun et en Côte d'Ivoire [30, 44, 45, 46]. Les références [47] et [48] ont même montré que l'agriculture semble être l'un des principaux facteurs responsables de la sélection de résistance chez *An. gambiae s.l.* en Afrique.

Comme dans les observations faites précédemment au Gabon (Libreville et au Port-Gentil) et dans la sous-région d'Afrique centrale, la résistance aux pyréthrinoïdes usuels est essentiellement liée aux mutations *kdr* [11, 15, 44, 49]. La PCR de diagnostic des mutations *Kdr* a montré la présence de la mutation *kdr* qui confère aux insectes, la résistance aux insecticides de la famille des pyréthrinoïdes. De même, les résultats de cette étude ont mis en évidence la co-existence des mutations *Kdr-w* et *Kdr-e* au sein des populations d'*An. gambiae s.l.* des sites prospectés, avec une prévalence du gène *kdr-w*. Cette co-occurrence des mutations *kdr-e* et *kdr-w* a été déjà décrite en Afrique centrale [15, 50, 51, 52] ainsi que la prédominance du gène *kdr-w* par rapport au gène *kdr-e* [14, 32, 49]. La présence de ces mutations dans les sites d'étude constitue une menace pour l'efficacité des stratégies de lutte anti-vectorielle basées sur l'utilisation des insecticides chimiques [53]. Les données de cette étude sont les premières du genre qui traitent de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes dans la région de Mouila. Aussi, des études similaires doivent être réalisées dans l'ensemble des quartiers de la ville de Mouila et leurs environs et, dans les autres localités du Gabon afin de connaître les vecteurs locaux de paludisme et leur niveau de sensibilité aux insecticides [11].

5 CONCLUSION

La présente étude a montré une résistance et/ou des suspicions de résistance du vecteur majeur (*An. gambiae s.l.*) du paludisme à quelques pyréthrinoïdes (alphacyperméthrine 0,05%, 0,25% et 0,50%, cyfluthrine 0,15%, bifenthrine 0,20%, l'etofenprox 0,5% et 2,5%) dans zones élaéicoles de la zone de Mouila. Cependant, ces anophèles sont encore sensibles à la cyfluthrine 0,75%. La résistance et les suspicions de résistance d'*An. gambiae s.l.* à ces divers pyréthrinoïdes montrent le danger auquel la population humaine est exposée. Ces données de cette étude pourraient servir à la mise en place des mesures de lutte anti-vectorielle complémentaires aux stratégies déjà en cours dans les sites d'étude. Des observations éthologiques des

anophèles face aux insecticides méritent d'être faites régulièrement afin de prévenir les phénomènes de résistance et, de mieux orienter les stratégies de lutte anti-vectorielle.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier, institutionnel et logistique du Laboratoire d'Ecologie Vectorielle (LEV), de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), de l'Institut de Recherche en Ecologie Tropicale (IRET), de l'Institut Régional de Santé Publique (IRSP), du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM), et de la société Olam Palm Gabon (OPG). Nos sincères remerciements à Pr Alain Souza, Dr Abdou Razack Safiou, Dr Paul Raoul Nguina Sanga, Pyazzi Obame Ondo, Audrey Mélodie Ovono et Gael Bibang Bengono pour leur aide multiforme. Nous remercions aussi chaleureusement, les chefs des localités de Mboukou, Doubou et Moutambe Sane Fomou ainsi que les populations pour leur collaboration et leur aide. Enfin, nous tenons à adresser notre gratitude aux Docteurs Ghislaine Nkone-Asseko et Spes Caritas Ntabangana de l'OMS-Gabon pour nous avoir fourni les papiers insecticides et les kits pour les tests de sensibilité aux insecticides.

REFERENCES

- [1] OMS, "Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme – seconde édition [Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2nd ed.]. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, 2017.
- [2] F. H. Collins and S. M. Paskewitz, "Malaria : Current and future prospects for control", *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 40, pp. 195-219, 1995.
- [3] C. Fanello, V. Petrarca, A. della Torre, *et al.*, "The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae s.s.*", *Insect Molecular Biology*, vol. 12, pp. 241-245, 2003.
- [4] L. Djogbenou, "Lutte antivectorielle contre le paludisme et résistance des vecteurs aux insecticides en Afrique", *Médecine Tropicale*, vol. 69, n°2, pp. 160-164, 2009.
- [5] N. P. Akono, A. Mbouangoro, A. Mbida Mbida, *et al.*, "Le complexe d'espèces *Anopheles gambiae* et le gène de résistance Kdr en périphérie de Douala, Cameroun", *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 110, pp. 122-129, 2017.
- [6] OMS, Rapport Mondial sur le paludisme.: Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 2017.
- [7] A. Dzeing-Ella, P. C. Nze Obiang, R. Tchoua, *et al.*, "Severe falciparum malaria in Gabonese children: clinical and laboratory features", *Malaria Journal*, vol. 4, n°1, 2005.
- [8] PNL, Rapport de synthèse sur la statistique épidémiologique du Gabon, Programme National de Lutte contre le Paludisme du Gabon, 2010.
- [9] E. H. Sylla, J. F. Kun and P. G. Kremsner, "Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malarial-endemic areas in Gabon", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 94, pp. 652–656, 2000.
- [10] N. Elissa, F. Migot-Nabias, A. Luty, *et al.*, "Relationship between entomological inoculation rate, *Plasmodium falciparum* prevalence rate, and incidence of malaria attack in rural Gabon", *Acta Trop.*, vol. 85, pp. 355-361, 2003.
- [11] J. R. Mourou, T. Coffinet, F. Jarjaval, *et al.*, "Malaria transmission and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in Libreville and Port-Gentil, Gabon", *Malaria Journal*, vol. 9, n° 32, pp. 1-8, 2010.
- [12] M. Coetzee, P. Van Wyk, M. Booman, *et al.*, "Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes in a gold mining town in Ghana and implications for malaria control", *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 99, n°5, pp. 400–3, 2006.
- [13] Y. E. Himeidan, H. Chen, F. Chandre, *et al.*, "Permethrin and DDT resistance in the malaria vector *Anopheles arabiensis* from eastern Sudan", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 77, n°6, pp. 1066–8, 2007.
- [14] M. Moreno, J. L. Vicente, J. Cano, *et al.*, "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, 2008.
- [15] J. Pinto, A. Lynd, N. Elissa, *et al.*, "Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon", *Med. Vet. Entomol.*, vol. 20, pp. 27–32, 2006.
- [16] J. F. Mavoungou, K. G. Ketoh, L. S. Djogbenou, *et al.*, "Etude entomologique en prélude à la Pulvérisation Intra-Domiciliaire dans les base-vies et bureaux d'Olam Palm Gabon à Mouila", Rapport d'étude, Programme National Lutte Paludisme Gabon, Libreville, 2017.
- [17] M. E. H. Burton, J. R. Poulsen, M. E. Lee, *et al.*, "Reducing Carbon Emissions from Forest Conversion for Oil Palm Agriculture in Gabon", *Conservation Letters*, vol. 0, n°0, pp. 1-11, 2016.

- [18] E. Tia, M. Akogbéto, A. Koffi, *et al.*, "Situation de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.s. (Diptera : Culicidae) aux pyréthrinoïdes et au DDT dans cinq écosystèmes agricoles de Côte d'Ivoire". *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 99, n°4, pp. 278–282, 2006.
- [19] A. Talipouo, P. Ntonga Akono, D. Tagne, *et al.*, "Comparative study of *Culicidae* biodiversity of Manoka island and Youpwe mainland area, Littoral, Cameroon", *Int. J. Biosci.*, vol. 10, n°4, pp. 9-18, 2017.
- [20] C. M. Egbuche, C. K. Ezihe, D. N. Aribodor, C. B. Ukonze, "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*, vol. 6, n°17, pp. 1-5, 2016.
- [21] B. Kone, Y. L. Konan, Z. I. Coulibaly, *et al.*, "Evaluation entomologique du risque d'épidémie urbaine de fièvre jaune survenue en 2008 dans le district d'Abidjan, Côte d'Ivoire". *Medecine et Santé Tropicales*, vol. 23, pp. 66-71, 2013.
- [22] F. Baldacchino F, C. Paupy, "Clé de détermination des *Culicidae* présents en Afrique Centrale et au Gabon", Document de travail, IRD/CIRMF, 2010.
- [23] WHO, "Test procedures for Insecticide Resistance Monitoring in malaria vector mosquitoes", Report of the WHO. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, World Health Organization, 2013.
- [24] L. Djogbenou, N. Pasteur, M. Akogbetto, M. Weill and F. Chandre, "Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey", *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 25, pp. 256–267, 2011.
- [25] C. Fanello, V. Petrarca, A. Della Torre, "Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR/RFLP", *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 16, pp. 461-464, 2002.
- [26] F. H. Collins, M. A. Mendez, M. O. Rasmussen, *et al.*, "A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of *Anopheles gambiae* complex", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 37, pp. 37-41, 1987.
- [27] G. Favia, A. Della Torre, M. Bagayoko, *et al.*, "Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *An. gambiae* and further evidence of their reproductive isolation", *Insect. Mol. Biol.*, vol. 6, n°4, pp. 377-383, 1997.
- [28] D. Martinez-Torres, F. Chandre, M. S. Williamson, *et al.*, "Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.", *Insect Molecular Biology*, vol. 7, pp. 179-184, 1998.
- [29] H. Ranson, B. Jensen, J. M. Vulule, *et al.*, "Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *An. gambiae* associated with resistance to DDT and Pyrethroids", *Insect Molecular Biology*, vol. 9, pp. 491-497, 2000.
- [30] E. Tia, M. Chouaibou, C. N. G. Gbalégba, *et al.*, "Distribution des espèces et de la fréquence du gène Kdr chez les populations d'*Anopheles gambiae* s.s. et d'*Anopheles coluzzii* dans cinq sites agricoles de la Côte d'Ivoire", *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 110, pp. 130-134, 2017.
- [31] W. S. Abbott, "A method of computing the effectiveness of an insecticide", *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, pp. 265-267, 1925.
- [32] J. R. Mourou, T. Coffinet, F. Jarjaval, *et al.*, "Malaria transmission in Libreville: results of a one year survey". *Malaria Journal*, vol. 11, pp. 1-14, 2012.
- [33] A. della Torre, Z. Tu and V. Petrarca, "On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 35, pp. 755–769, 2005.
- [34] C. Kamdem, B. Tene Fossog, F. Simard, *et al.*, "Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*", *PLoS One*, vol. 7, n°6, e39453, 2012.
- [35] T. Lehmann and A. Diabate, "The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective", *Infect. Genet. Evol.* Vol. 8, n°5, pp. 737–46, 2008.
- [36] CNEV, *Utilisation des insecticides et gestion de la résistance*, Centre National d'Expertise sur les Vecteurs, 71p, 2014.
- [37] P. Nwane, J. Etang, M. Chouaibou, *et al.*, "Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon", *BMC Infectious Disease*, vol. 9, pp. 163, 2009.
- [38] C. Antonio-Nkondjio, B. Tene Fossog, C. Ndo, *et al.*, "*Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution", *Malaria Journal*, vol. 10, pp. 154-167, 2011.
- [39] C. Kerah-Hinzoumbé, M. Péka, P. Nwane, *et al.*, "Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from south-western Chad, Central Africa", *Malaria Journal*, vol. 7, pp. 192-201, 2008.
- [40] E. Metelo, G. K. Ilombe, G. M. Binene, *et al.*, "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.
- [41] K. G. Konan, A. B. Koné, Y. L. Konan, *et al.*, "Résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes et au DDT à Tiassalékro, village de riziculture irriguée en zone sud forestière de Côte-d'Ivoire", *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 104, pp. 303-306, 2011.

- [42] M. Akogbeto, N. Noukpo and G. Ahoueya, "Analyse de la résistance des *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes et leurs formes moléculaires et chromosomiques, par des méthodes de titrage biologiques de l'OMS et du CDC et par des techniques PCR au Bénin". Rapport MIM/AFRO/ OMS/TDR, 2001.
- [43] M. L. Olé-Sangba, A. Sidick, R. Govoetchan, *et al.*, "Evidence of multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* populations in Bangui, Central African Republic", *Parasites & Vectors*, vol. 10, pp. 23 (1-10), 2017.
- [44] M. Akogbeto, R. Djouaka and H. Noukpo, "Use of agricultural insecticides in Benin", *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 98, pp. 400-405, 2005.
- [45] C. Kamdem, C. Fouet, S. Gamez and B. J. White, "Pollutants and Insecticides Drive Local Adaptation in African Malaria Mosquitoes", *Mol. Biol. Evol.*, vol. 34, n°5, pp. 1261-1275, 2017.
- [46] P. Ntonga Akono, A. Mbida Mbida, P. Awono Ambene, *et al.*, "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 et Vie)*, vol. 73, n°2, pp. 132-141, 2018.
- [47] F. Chandre, F. Darriet, L. Manga, *et al.*, "Situation de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles gambiae sensu lato*", *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, Recueil d'articles n°1*, vol. 77, n°3, pp. 230-234, 1999.
- [48] F. Chandre, T. Baldet, J. Hemingway, *et al.*, "Usage des insecticides en agriculture et résistance des vecteurs du paludisme en Afrique", Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR, 2001.
- [49] J. Etang, E. Fondjo, F. Chandre, *et al.*, "First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 74, n°5, pp. 795-797, 2006.
- [50] L. Reimer, E. Fondjo, S. Patchoké, *et al.*, "Relationship between kdr mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of *Anopheles gambiae*". *J. Med. Entomol.*, vol. 45, n°2, pp. 260-266, 2008.
- [51] P. Nwane, J. Etang, U. M. Chouasmall yi, *et al.*, "Kdr based insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.s.* populations", *BMC Res. Notes.*, vol. 4, pp. 463-472, 2011.
- [52] C. Antonio-Nkondjio, N. Sonhafouo-Chiana, C. S. Ngadjeu, *et al.*, "Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017". *Parasites & Vectors*, vol. 10, pp. 472-487, 2017.
- [53] L. Kelly-Hope, H. Ranson and J. Hemingway, "Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programs", *Lancet Infectious Diseases*, vol. 8, pp. 387-389, 2008.