

Etude De L'efficacité Du Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) De *Anacardium Occidentale L.* Extrait À Froid Sur Le Contrôle De *Anopheles Gambiae S.L* Résistant Aux Pyréthriinoïdes

Armand A. Akpo

Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Daniel C. Chougourou

Ecole polytechnique d'Abomey-Calavi, Département Génie de l'Environnement, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Armel Djènonlin

Laboratoire Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Joseph Dossou

Département de Nutrition et Sciences Alimentaires, Faculté des Sciences Agronomiques (FSA), Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin

Rodrigue Anagonou

Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Martin Akogbéto

Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

doi: 10.19044/esj.2017.v13n24p249 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p249](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p249)

Abstract

In order to combat the vectors of malaria, it is necessary to know their behavior with regard to the insecticide products envisaged. The present study is aimed at the CNSL efficiency test extracted from the seed hull of *Anacardium occidentale L.* for the control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae s.l.* Sensitivity tests were carried out on the larvae of stages 2, 3 and 4 of *An. gambiae* of the wild and Kis-kdr strains carrying the Kdr gene. The "Kisumu" strain devoid of resistance gene served as a control. The mortalities were read after 24 hours of exposure. LD50 and DL90 were determined using the log-probit method of dose determination corresponding to a proportion. The high LD50 determined is 0.0042 mg / ml and corresponds to the LD50 of the larvae of stage 2 of the wild strain. The low LD50 is determined on stage 2 larvae "Kisumu". The high DL90 is determined on stage 4 larvae of the wild strain. The low LD90 determined

corresponds to stage 2 larvae "Kisumu". The comparison of the LD between the different strains shows a low sensitivity to CNSL of the larvae of resistant strains compared to the control strain, indicating the influence of the resistance factor *kdr* on the CNSL efficiency. However, the low-dose CNSL larvicidal activity on the larvae of the *kdr*-carrying strains provides an alternative advantage in the management of vector resistance to pyrethroids.

Keywords: Larvicidal activity, sensitivity test, resistant *An. gambiae*, vector control

Résumé

Pour lutter contre les vecteurs du paludisme, il est nécessaire de connaître leur comportement vis-à-vis des produits insecticides envisagés. La présente étude vise l'étude de l'efficacité du CNSL extrait à froid de la coque des graines de *Anacardium occidentale L.* sur le contrôle de *Anopheles gambiae s.l* résistant aux pyréthriinoïdes. Des tests de sensibilité ont été réalisés sur les larves des stades 2, 3 et 4 de *An. gambiae* des souches sauvage et Kis-*kdr* porteuses de gène *Kdr*. La souche «Kisumu» dépourvue de gène de résistance a servi de témoin. Les mortalités ont été lues après 24 heures d'exposition. Les DL50 et DL90 ont été déterminées suivant la méthode log-probit de détermination de la dose correspondant à une proportion. La forte DL50 déterminée est de 0,0042 mg/ml et correspond à la DL50 des larves de stade 2 de la souche sauvage. La faible DL50 est déterminée sur les larves de stade 2 «Kisumu». La forte DL90 est déterminée sur des larves de stade 4 de la souche sauvage. La faible DL90 déterminée correspond aux larves de stade 2 «Kisumu». La comparaison des DL entre les différentes souches montre une faible sensibilité au CNSL des larves de souches résistantes par rapport à la souche témoin, ce qui indique l'influence du gène de résistance *Kdr* sur l'efficacité du CNSL. Toutefois, l'activité larvicide du CNSL à faible dose sur les larves des souches porteuses du gène *Kdr* offre un avantage alternatif dans la gestion de la résistance des vecteurs aux pyréthriinoïdes.

Mots clés: Activité larvicide, test de sensibilité, *An.gambiae* résistant, lutte antivectorielle

Introduction

La pharmaco-résistance du *Plasmodium falciparum* remarquée suite au traitement des différentes formes (simple ou grave) du paludisme avec la propagation de la résistance des vecteurs aux pyréthriinoïdes (Akogbéto et Yakoubou, 1999) et aux carbamates (Djogbénou *et al.* 2010 ; Aikpon *et al.*,2013) constituent un véritable facteur ayant limité la réussite des objectifs de l'OMS (Organisation Mondiale de Santé) vis-à-vis de cette parasitose. En

effet, les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action et les pulvérisations intra domiciliaires sont les principaux moyens de lutte utilisés par les programmes nationaux dans la lutte contre les vecteurs de maladies. A cet effet, quatre classes d'insecticides sont recommandées par l'OMS. Il s'agit des carbamates, les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthrinoides. L'utilisation de ces moyens de lutte antivectorielle a permis entre temps de réduire, non seulement la transmission du parasite mais aussi la nuisance infligée par les piqûres des moustiques (Carnevale *et al.*, 1988; Magesa *et al.*, 1991; Beach *et al.*, 1993; Akogbéto *et al.*, 1995 ; Akogbéto *et al.*, 2010 ; Mashauri *et al.*, 2013). Toutefois, il a été révélé suite à l'usage des produits chimiques dans la lutte contre le paludisme, une sélection et une expansion remarquables de la résistance des vecteurs aux insecticides dans le temps, dans l'espace et de génération en génération (Hamon, 1963a ; Elissa *et al.*, 1993 ; Vulule *et al.*, 1994 ; Akogbéto et Yakoubou, 1999; Chandre *et al.*, 1999; Diabate *et al.*, 2002b; Corbel *et al.*, 2007; Yadouléon *et al.*, 2010). Au Bénin en particulier, les travaux réalisés dans ce domaine ont montré que la fréquence allélique du gène de résistance *kdr* qui confère la résistance croisée au DDT et aux pyréthrinoides est supérieure à 75% (Gnanguéon *et al.*, 2015). D'autres études réalisées au Bénin sur la dynamique spatiale de la propagation de la résistance aux insecticides ont confirmé cette résistance et son évolution dans le temps et dans l'espace (Djogbénou *et al.*, 2010; Sovi *et al.*, 2013; Djègbè *et al.*, 2014; Gnanguéon *et al.*, 2015), ce qui incrimine l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides prouvée par N'Guéssan *et al.* (2007) en case expérimentale. Les différents mécanismes de résistance développés par les moustiques vis-à-vis des insecticides chimiques et connus sont : (1)- la modification de la cible des pyréthrinoides et des organochlorés sur le codon 1014 du canal sodium voltage dépendant (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000); (2)- la résistance cuticulaire et (3)- la résistance métabolique. Ce dernier est caractérisé généralement par une surproduction des enzymes de détoxification susceptibles de détruire l'insecticide avant son contact avec la cible. Les travaux réalisés par Agossa *et al.* (2015) sur les mécanismes biochimiques de la résistance de *An. gambiae* ont montré une activité significativement élevée de certaines enzymes de détoxification telles que les oxydases, les estérases (α et β estérases), les glutathion-S-transférases. La présence, généralement conjointe de ces différentes formes de résistance à forte fréquence dans les populations des vecteurs et leur expansion considérable au Bénin sont bien liées à l'usage massif, continu et fréquent d'un même insecticide ou des insecticides étroitement liés, non seulement en santé publique, mais aussi et surtout en agriculture (Akogbéto *et al.*, 2006; Chouaibou *et al.*, 2008; Yadouléon *et al.*, 2010), ce qui exerce une pression sélective sur les larves et les adultes des vecteurs. La gestion de

la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides doit alors être partie intégrante de la stratégie de lutte intégrée contre le paludisme. L'une des mesures alternatives prônée est l'usage des outils et méthodes de lutte non chimiques pour autant qu'ils contribuent efficacement à lutter contre les vecteurs résistants. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux biopesticides obtenus à partir des graines de *Anacardium occidentale L.* pour le contrôle de *An.gambiae* s.s résistant aux pyréthriinoïdes. Cette étude a permis d'évaluer l'efficacité (propriétés larviques) du CNSL contre les populations résistantes et sensibles des vecteurs du paludisme au Bénin.

Matériel et méthodes

Zone d'étude

L'étude a été menée entre novembre 2014 et décembre 2015 dans la ville de Cotonou, département du Littoral (Bénin) précisément dans les localités de Zogbo, Ladji, Fifadji, Gbèdjromédé, Houéyiho 1, Houéyiho 2, Minontchou, Yénawa et Sourou-Léré (figure 1). La ville de Cotonou a des caractéristiques géographiques qui sont favorables à la prolifération des moustiques. Elle présente une plaine sableuse sans relief, avec une nappe phréatique peu profonde et affleurant le sol (Akogbéto, 1992). Cette absence de relief, associée à un mauvais drainage des eaux, provoque des inondations pendant les saisons pluvieuses et favorise la multiplication des gîtes des Culicidae dont *An. gambiae* (Akogbéto et Yakoubou, 1999; Akogbéto, 1992). Par ailleurs, la ville de Cotonou est marquée par l'aménagement des terres et périmètres maraîchers, qui créent de véritables gîtes de Culicidae dont *An.gambiae*, le principal vecteur du paludisme (Akogbéto, 1992; Akogbéto, 1995). Cotonou abrite aussi le plus grand port du pays qui importe et exporte des conteneurs dans lesquels peuvent se cacher des moustiques venant d'autres horizons. Ces caractéristiques de la ville créent à ses habitants une nuisance culicidienne très forte. En effet, on y rencontre des flaques d'eau, des marécages temporaires et permanents, des pneus abandonnés ou stockés dans des garages à ciel ouverts...etc. C'est l'une des villes les plus affectées par le paludisme au Bénin (MS, 2013).

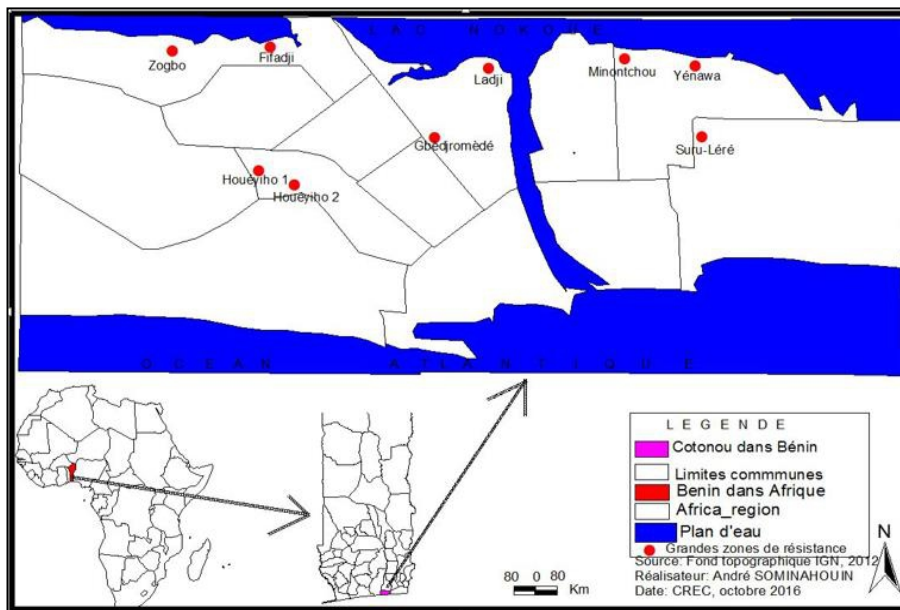


Figure 1: Carte montrant la zone d'étude

Matériel biologique

Matériel animal

Les tests ont été réalisés sur les larves de *An. gambiae* s.l. Trois souches ont été utilisées. Il s'agit de la souche de référence sensible «Kisumu» de génotype SS, la souche Kis-kdr de génotype RR, résistante aux pyréthrinoides et aux organochlorés puis la souche sauvage caractérisée par une fréquence allélique élevée (>80%) du gène de résistance Kdr. Les souches Kisumu et Kis-kdr sont élevées à l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). Les anophèles femelles adultes des deux souches sont conditionnés à une température de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ grâce à un climatiseur qui fonctionne en permanence. La ponte des moustiques est assurée par des repas sanguins. Pour cela, des femelles âgées de trois à cinq jours sont gorgées pendant une vingtaine de minutes grâce à des lapins immobilisés sur des cages de moustiques par un dispositif élaboré en conséquence. Après le repas sanguin, les femelles gorgées sont continuellement nourries au jus de miel à 10% dans du coton déposé sur le tulle moustiquaire des cages. Cela sert de nourriture pour les femelles gravides. Après la ponte, les œufs des différentes souches sont récoltés quotidiennement en retirant les pondoires des cages. Les pondoires sont systématiquement renouvelés après chaque retrait. Les œufs recueillis sont mis en eau (l'eau de robinet) dans des bacs en vue de leur éclosion. La salle d'élevage des larves est conditionnée à une plage de températures de 29°C à 32°C favorables au développement des stades pré imaginaires des moustiques et ceci à l'aide d'un radiateur de chauffage qui diffuse des calories par rayonnement. Les larves obtenues après éclosion sont nourries de croquette

de chat dès le premier stade. L'eau d'élevage est renouvelée après 72 heures afin de garantir une bonne croissance des larves. Cela a permis d'obtenir des larves de stades 1, 2, 3, 4 et les nymphes des différentes souches. Les larves et nymphes des moustiques sauvages sont récoltées directement dans les gîtes des sites d'étude aux moyens de louches, de pipettes Pasteur, de bocaux et de filtres à mailles serrées pouvant retenir les larves de différents stades.

Matériel végétal

La matière végétale sujette de notre étude a été prélevée sur des plantes issues de la flore béninoise (tableau 1).

Tableau 1: Espèce végétale et organe utilisés

Espèce végétale	Partie utilisée	Nature des extraits	Méthodes
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Coque des graines	CNSL à froid	Coque brute, fragilisée sans traitement préalable et soumise à l'extraction par presse à vis

CNSL : Cashew Nut Shell Liquid

Description de la méthode d'extraction à froid du CNSL

L'extraction du CNSL a été réalisée au laboratoire (Laboratoire de Bio ingénierie et de Production Alimentaire de la Faculté des Sciences Agronomique, Université d'Abomey-Calavi) à froid avec presse des coques brutes des noix de *Anacardium occidentale* fragilisées. La fragilisation des noix se fait à la vapeur grâce à un système constitué d'une source de chaleur, chauffant l'eau contenue dans une chaudière jusqu'à une température entraînant une pression de 10 bars. Cette pression correspond à une température de 180°C. La chaudière est reliée à un autoclave (contenant les noix à fragiliser) par un conduit muni d'une vanne qui s'ouvre lorsque la pression atteint les 10 bars.

Tests larvaires : Etude de l'efficacité du CNSL extrait à froid sur les larves de *An. gambiae* s.s résistants aux pyréthrinoides

Les tests larvaires ont été réalisés au CREC sur les larves des stades 2,3 et 4 des souches sensibles «Kisumu» et résistantes (Kis-Kdr de laboratoire et sauvages) conformément au protocole préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé (Abbott, 1925; OMS, 1963, 2004 & 2014). Les larves sont exposées à des gammes de concentrations de la matière insecticide dans des gobelets contenant chacun 20 larves. Pour chaque stade larvaire des différentes souches de moustiques, des concentrations formulées à partir du CNLS ont été préparées en plus des témoins à raison de cinq répétitions par concentration de l'extrait. Les concentrations sub-létales ont été choisies de manière à obtenir des taux de

mortalité pouvant varier de 0% à 100%. Les larves mortes après 24 heures d'exposition aux produits insecticides formulés sont dénombrées suivant chaque dose appliquée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité. Ce qui est déterminé en additionnant les nombres de larves mortes dans les répliques de chaque concentration du test d'exposition par rapport au nombre total de larves de moustique exposées. Les mortalités dans les lots témoins sont également déterminées de la même manière selon la formule:

Mortalité au cours du test

$$= \frac{\text{Nombre total de larves mortes}}{\text{Taille totale de l'échantillon} - \text{Nombre de nymphes}} \times 100$$

Lorsque le taux de mortalité enregistré au niveau des témoins est supérieur à 20%, le test est invalide. Si la mortalité des témoins est supérieure à 5% et inférieure à 20%, la mortalité observée est corrigée par la formule d'Abbott :

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{ mortalité lors du test} - \% \text{ mortalité témoin}}{100 - \% \text{ mortalité témoin}}$$

Si la mortalité au niveau du témoin est inférieure à 5% elle peut être ignorée et bien, aucune correction n'est nécessaire.

Pour la détermination des DL-50 et DL-90 au CNSL sur les différents stades larvaires, le logiciel R Core Team (Version 3.3.1-2016) a été utilisé. La méthode utilisée est celle de log-probit de détermination de la dose correspondant à une proportion donnée.

Formulation du CNSL extrait à froid.

Une solution stock du CNSL dans l'éthanol a été préparée. A partir de cette solution mère, une série de concentrations a été réalisée en vue de varier les doses pouvant induire des mortalités allant de 0% à 100%. La dispersion de 30 mg de baume nécessite $\frac{1}{10}$ ml d'éthanol dans un volume de 30 ml d'eau distillée. La solution stock a été donc préparée en dissolvant 200 mg de baume dans 66.10^{-2} ml d'éthanol pour un volume total de 200 ml d'eau distillée.

Résultats

Le CNSL extrait à froid a montré un effet larvicide sur les larves de stade 2, 3 et 4 des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvages. Les mortalités enregistrées sont comparées à chaque stade pour les trois souches testées.

Efficacité du CNSL extrait à froid sur les larves de stade 2 des souches sensible Kisumu, Kis-kdr et sauvage de *An. gambiae s.l.*

Après avoir exposé les larves de stade 2 des souches sensible Kisumu, Kis-kdr et sauvage aux différentes concentrations du CNSL, le taux de mortalité enregistré varie en fonction des concentrations (figure 2). Les larves de stade 2 des trois souches ont une sensibilité différentielle vis-à-vis du CNSL extrait à froid. Pour une forte dose de 0,01mg/ml, on enregistre une mortalité de 100% des larves des trois souches. En dessous de cette dose, les mortalités enregistrées au niveau des larves des populations sauvages diminuent progressivement et atteignent une valeur inférieure à 80% à une dose de 0,005 mg/ml. Cependant, on enregistre toujours une mortalité de 100% des larves des souches Kis-kdr et Kisumu à cette concentration de 0,005 mg/ml. La faible dose entraînant 100% de mortalité de la souche «Kisumu» est 0,00375 mg/ml. Elle est de 0,005 mg/ml pour la souche Kis-kdr alors que la mortalité des larves de la souche sauvage atteint le plafond des 100% à partir de la concentration de 0,01 mg/ml. La mortalité des larves sauvages atteint les 50% à une dose inférieure à 0,0025mg/ml. Concernant les larves de la souche «Kisumu», les 50% de mortalité sont enregistrés à une dose inférieure à 0,001 mg/ml. La mortalité des larves des populations sauvages diminue et tend à s'annuler à une dose de 0,001 mg/ml alors que cette dose entraîne une mortalité supérieure à 20% des larves Kis-kdr et 70% des larves de la souche sensible «Kisumu». Il ressort de ces observations que les larves de stade 2 sauvages sont moins sensibles au CNSL extrait à froid que les larves de la souche Kis-kdr qui sont aussi moins sensibles que la souche «Kisumu».

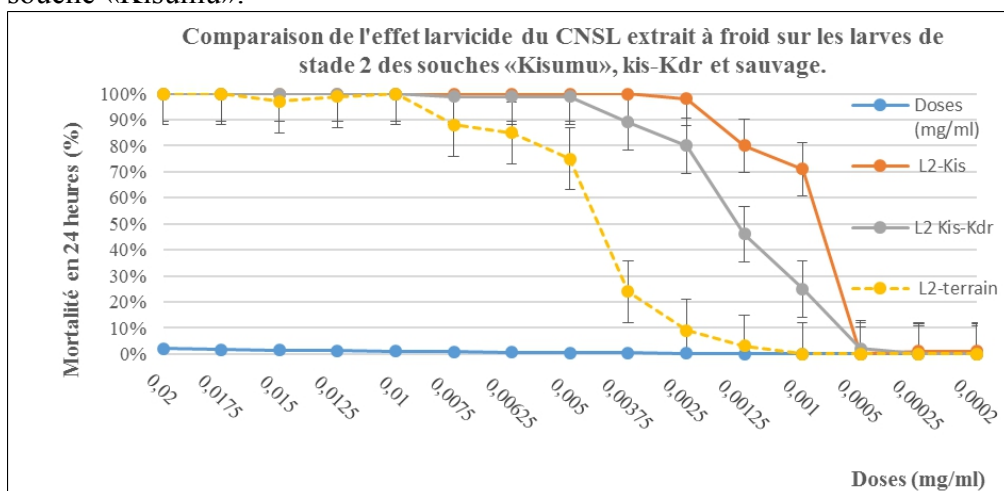


Figure 2: Comparaison de l'effet larvicide du CNSL extrait à froid sur les larves de stade 2 des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage.

Efficacité du CNSL extrait à froid sur les larves de stade 3 des souches sensible «Kisumu», Kis-kdr et sauvage de *An.gambiaes.l.*

La figure 3 montre l'évolution des pourcentages de mortalité des larves de stade 3 des trois populations de moustiques étudiées en fonction des doses testées. Les mortalités enregistrées sur les larves de stade 3 des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage varient en fonction des doses formulées. A 0,01mg/ml, on note 100% de mortalité au niveau des trois souches testées. En dessous de cette dose on observe une régression progressive des mortalités de la souche sauvage alors qu'une similarité a été notée sur les souches Kis-kdr et «Kisumu» aux doses allant de 0,01 à 0,00625 mg/ml. Cependant, on note à ces doses que les larves de souche sauvage sont moins sensibles par rapport aux souches Kis-kdr et «Kisumu». En dessous de la dose 0,00625 mg/ml, le taux de mortalité des trois souches diminue progressivement avec une similarité notée entre les doses allant de 0,005 à 0,00375 mg/ml sur les souches «Kisumu» et sauvage. En dessous de ces doses, les souches sauvages, Kis-kdr et «Kisumu» présentent une mortalité diminuant progressivement et qui s'annule à 0,00125 mg/ml. Les larves de souche sauvage présentent une sensibilité faible par rapport aux souches «Kisumu» et Kis-kdr aux doses allant de 0,0125 à 0,005 mg/ml puis aux doses inférieures à 0,00375mg/ml et supérieures à 0,00125mg/ml. Toutefois les larves de souche sauvage présentent un caractère moins sensible avec des mortalités plus faibles que celles enregistrées au niveau de la souche Kis-kdr pour les doses de 0,01 à 0,00125 mg/ml.

Ces résultats enregistrés montrent que les larves de stade 3 des populations de *An. gambiae* sauvages sont moins sensibles au CNSL extrait à froid par rapport à la souche Kis-kdr.

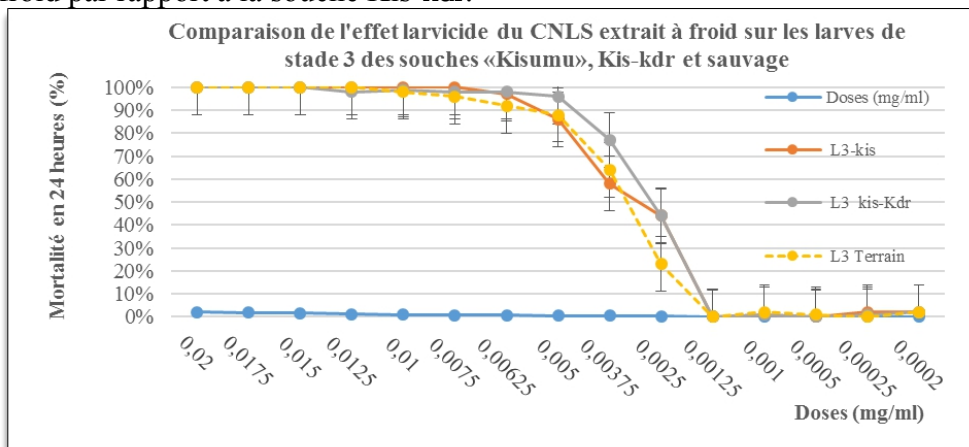


Figure 3: Comparaison de l'effet larvicide du CNSL extrait à froid sur larves de stade 3 des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage.

Effacité du CNSL extrait à froid sur les larves de stade 4 des trois souches de *An. gambiae* s.l étudiées.

La figure 4 montre l'évolution des pourcentages de mortalités des larves de stade 4 des trois souches étudiées en fonction des doses testées. Cette figure indique une mortalité de 100% des larves de stade 4 de la souche sauvage à la dose limite de 0,015 mg/ml. En dessous de cette dose, la mortalité de ces larves régresse progressivement et atteint les valeurs limites de 70% correspondant à 0,0075 mg/ml qui est la limite inférieure induisant 100% de mortalité des larves de la souche «Kisumu». En dessous de cette dose, on observe une faible pente dans la représentation graphique (figure 4) exprimant la variation du taux de mortalité des larves de la souche «Kisumu» et celles des populations de souche sauvage. Cette faible pente enregistrée traduit une faible activité larvicide du CNSL aux doses allant de 0,0075 à 0,005 mg/ml. La mortalité dépasse les 50% sur les souches porteuses du gène Kdr et la souche témoin «Kisumu» à partir de la dose de 0,00375 mg/ml et s'annule d'abord au niveau de la souche sauvage avec les doses inférieures à 0,00125 mg/ml. Chez les souches kis-kdr et «Kisumu», la mortalité devient nulle avec les doses inférieures ou égales à 0,0005 mg/ml. Avec les doses allant de 0,015 à 0,00125 mg/ml, les larves des populations sauvages manifestent une faible sensibilité au CNSL extrait à froid par rapport aux souches Kis-kdr et «Kisumu». De 0,005 mg/ml aux limites supérieures de 0,00125 mg/ml, la souche Kis-kdr apparaît moins sensible que la souche «Kisumu». A 0,00125 mg/ml, la souche Kisumu paraît moins sensible que la souche Kis-kdr. En dessous de cette dose jusqu'à 0,0005 mg/ml, les souches Kis-kdr et «Kisumu» présentent une faible sensibilité avec une activité larvicide plus forte du CNSL sur la souche «Kisumu».

Il ressort donc de ces résultats que le CNSL présente une activité larvicide intéressante sur les larves de stade 4 des souches sauvages, Kis-Kdr et «Kisumu». Cependant, les souches sauvage et Kis-kdr apparaissent moins sensibles que la souche de référence sensible «Kisumu».

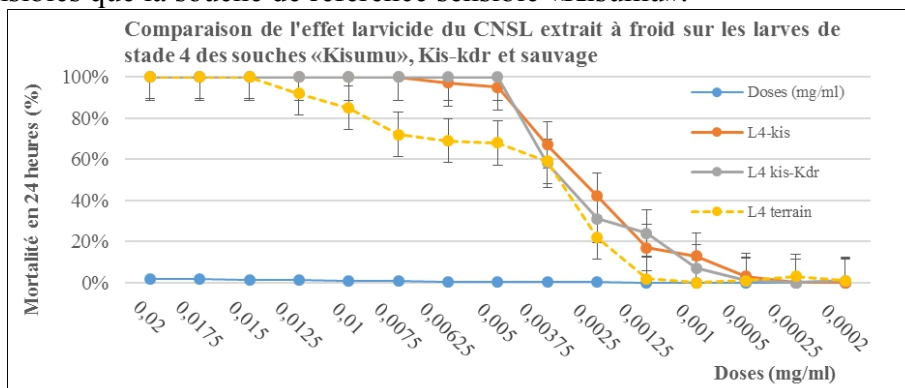


Figure 4: Comparaison de l'effet larvicide du CNSL extrait à froid sur les larves de stade 4 des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage

Comparaison des DL50 et DL90 du CNSL sur les larves de stade 2, 3 et 4 de *An. gambiae* des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage

A l'issu de nos travaux, nous avons comparé les DL50 et DL90 du CNSL des stades des différentes populations de moustiques. La représentation graphique ci-dessous (figure 5) regroupe l'ensemble des DL50 et DL90 des différents stades des différentes populations. Le CNSL extrait à froid a une activité larvicide sur les larves de moustique de souches sensible et celles résistant aux pyréthriinoïdes. La détermination des DL50 et DL90 du CNSL sur les larves des stades 2, 3 et 4 des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage a montré une activité larvicide à faible dose et variant d'une souche à une autre. La forte DL50 enregistrée est de 0,0042 mg/ml et correspond à la DL50 des larves de stade 2 des populations de moustiques sauvages. La faible DL50 enregistrée est de 0,0009 mg/ml et correspond à la DL50 des larves de stade 2 «Kisumu». Concernant la DL90, la plus forte enregistrée est de 0,0107 mg/ml et correspond à la DL90 des larves de stade 4 des souches sauvages. La faible DL90 est 0,0015 mg/ml et correspond à la DL90 des larves de la souche «Kisumu» au stade 2. Aux stades 2 et 4, les DL50 déterminées ont révélé que les larves des populations de moustiques sauvages sont moins sensibles au CNSL que la souche Kis-kdr qui est aussi moins sensible que la souche «Kisumu». Au stade 3, les larves Kis-kdr apparaissent moins sensibles. Les DL90 montrent aux stades 2, 3 et 4 une faible sensibilité des larves de la souche sauvage au CNSL comparativement aux larves de la souche Kis-kdr, lesquelles sont moins sensibles que la souche «Kisumu». Il apparait donc à travers la variation des doses létales selon les souches testées porteuses ou non du facteur de résistance kdr que la présence de ce facteur de résistance influence la sensibilité des larves de *An. gambiae* s.sau CNSL extrait à froid.

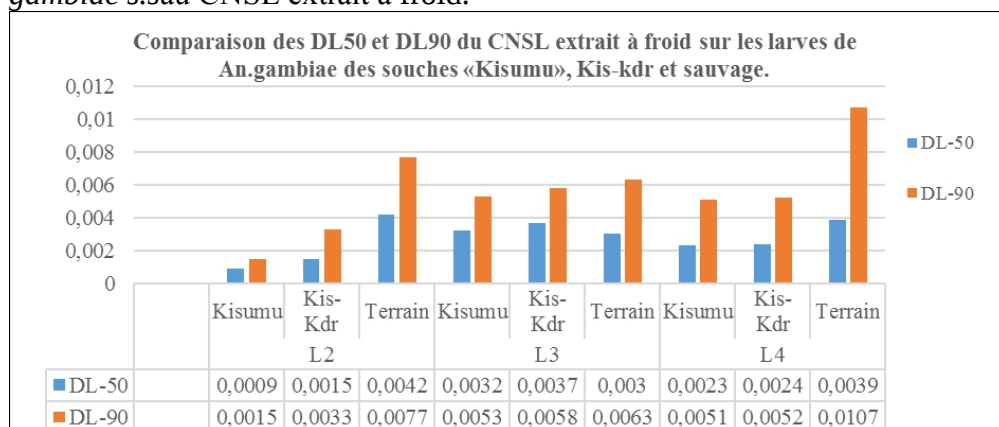


Figure 5: Comparaison des DL50 et DL90 du CNSL extrait à froid sur les larves de *An. gambiae* s.s des souches «Kisumu», Kis-kdr et sauvage.

Discussion

L'intégration d'un insecticide nouveau pour la lutte contre les vecteurs dans le contexte de la gestion de la résistance nécessite la bonne connaissance de l'effet insecticide du produit envisagé vis-à-vis des vecteurs cibles. La présente étude est consacrée à l'étude de la sensibilité des larves de *An. gambiae* résistant aux pyréthrinoides.

La forte sensibilité à faible dose au CNSL des larves de souche pourvue de l'allèle de résistance Kdr constitue une bonne nouvelle dans le cadre de la mise en œuvre des mesures alternatives pour la gestion de la résistance des vecteurs en santé humaine. Toutefois, l'activité larvicide du CNSL à faible dose sur les larves des populations sensibles pourrait par ailleurs engendrer une pression sélective des vecteurs cibles, donc une nouvelle émergence des vecteurs pouvant tolérer des doses létales en ce sens que la sélection des gènes de résistance est généralement induite avec le contact des doses faibles de polluants (David *et al.* 2006; Nkya *et al.*, 2014; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2014; Poupardin *et al.*, 2008; Raghavendra *et al.*, 2010). Il faut noter aussi sur cet aspect de sélection éventuelle des vecteurs résistant que très peu d'étude ont prouvé jusque-là et de façon tangible les risques de résistance liés à l'usage des biopesticides.

La sensibilité différentielle enregistrée sur les souches sauvage et Kis-kdr toutes porteuses de du gène kdr par rapport à la souche de référence «Kisumu» indique bien l'influence de l'expression du gène kdr sur la sensibilité au CNSL des larves. Une zone de forte fréquence des allèles du gène kdr (Djogbénu *et al.*, 2010; Sovi *et al.*, 2013; Djègbè *et al.*, 2014; Gnanguénon *et al.*, 2015). La faible sensibilité de ces larves issues des populations sauvages vis-à-vis du CNSL par rapport à la souche Kis-kdr caractérisée par le portage d'un seul gène de résistance nous a amené à envisager l'implication d'autres mécanismes de résistance intrinsèques susceptibles d'influencer l'efficacité du CNSL sur les vecteurs qui sont déjà résistants aux pyréthrinoides. Les milieux de développement des larves de *An. gambiae* s.l. sauvage seraient donc un facteur déterminant leur comportement vis-à-vis des produits insecticides. En effet les travaux de Agossa, (2016) ont montré la présence, non seulement des particules des insecticides utilisés contre les vecteurs en santé humaine et animale et les ravageurs des cultures, mais aussi des polluants d'origine anthropique qui exercent une pression de sélection sur les larves dans les gîtes naturels. Le développement des larves dans ces gîtes indique une forte adaptation aux facteurs environnementaux. La résistance métabolique peut être envisagée comme moyen utilisé par les larves pour survivre dans leur milieu naturel. Cette forme de résistance est caractérisée par la production d'enzyme de détoxification qui dégrade les molécules pouvant exercer une activité létale sur l'insecte. Et du fait que les larves des moustiques sauvages résistant aux

pyréthrinaïdes sont moins sensibles au CNSL par rapport à la souche de laboratoire pourvue uniquement du gène kdr, l'étude de l'influence de la résistance métabolique sur l'efficacité du baume mérite d'être vérifiée dans ce contexte. Toutefois, on pourra se réjouir de l'effet biocide du CNSL sur les larves des souches porteuses de gènes Kdr, en envisageant toutes formulations pouvant améliorer son efficacité dans la gestion de la résistance des vecteurs du paludisme, ce qui pourra préserver l'environnement des conséquences liées à l'usage des insecticides chimiques sice produit disposait d'un caractère moins toxique pour l'environnement avec une bonne innocuité.

Conclusion

Il ressort de cette étude que le CNSL est efficace dans la gestion des vecteurs résistants. A forte dose, son efficacité est plus renforcée. Le CNSL peut être un bon candidat alternatif dans la lutte anti-larvaire. Cependant, nous suggérons pour l'élaboration des formulations pouvant optimiser son efficacité d'autres études comme celles d'impact environnemental, l'efficacité du baume dans les conditions naturelles. Les DL50 et DL90 des différents stades larvaires des souches testées ont montré que les larves des populations sauvages et kis-kdr sont moins sensibles par rapport à celles de la souche «kisumu» témoin. La sensibilité au CNSL des larves est réduite chez les anophèles résistant aux pyréthrinaïdes. Toutefois l'activité larvicide du CNSL à faible dose sur les larves des souches sauvage et kis-kdr offre un avantage dans la lutte contre les vecteurs résistants. Sa mise en œuvre devrait être une lutte respectueuse pour l'environnement et accessible pour les populations exposées aux risques de nuisance des vecteurs et de transmission du paludisme.

References:

1. Abbott, W.S, 1925“A method of computing the effectiveness of an insecticide”, J. Econ. Entomo. vol. 18, pp. 265-267.
2. AGBIZOUNON A., 2010: Tests d'efficacité d'extraits d'huiles végétales sur *Anopheles gambiae* Giles et *Culex quinquefasciatus* Say résistants aux pyréthrinaïdes. Mémoire Ingénieur de conception, EPAC Abomey- Calavi, Bénin. 51pp.
3. Aïkpon R., Agossa F., Ossè R., Oussou O., Aïzoun N., Oké-Agbo F. & Akogbéto M. 2013 : Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* sl populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors* 6: 192–198.
4. Akogbeto M, Djouaka R, Gazard D. A., 2006: Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malar J* 2006, 5:22.

5. Akogbéto M. et Yakoubou S., 1999: Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 92(2): 123-130.
6. AKOGBETO M., 1995 : Etude entomologique sur la transmission du paludisme côtier lagunaire : cas d'un village construit sur un lac d'eau saumâtre. *Ann. Soc. Belge Med trop.* 75, 219-227.
7. Akogbéto M., Chippaux J.-P. & Coluzzi M. 1992. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin). Étude entomologique. *Revue d'Epidémiologie et Santé Publique* 40: 233–239.
8. Antonio-Nkondjio C., Youmsi-Goupeyou M., Kopya E., Tene-Fossog B., Njiokou F.,
9. Beach R.F., Ruebush T.K., Sexton J.D., Bright P.L., Hightower A.W., Breman J.G., Mount D.L. & Oloo A.J. 1993. Effectiveness of Permethrin-Impregnated Bed Nets and Curtains for Malaria Control in a Holoendemic Area of Western Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 290–300.
10. Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., Satrani B., 2009: Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions*. 20(1) 44.
11. Carnevale P. 1998. La protection du voyageur contre les piqures d'arthropodes vecteurs. *Bull Soc Pathol Exot* 91: 474–485.
12. Chandre F., Darrier F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J. & Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 230–234.
13. Cheng, S.S., Liu, J.Y., Tsai, K.H., Chen, W.J., Chang, S.T., 2004: Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum* spp. provenances. *J. Agric. Food Chem.* 52 4395.
14. Chouaïbou M., Etang J., Brevault T., Nwane P., Hinzoumbé C.K., Mimpfoundi R. & Simard F. 2008. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* sl from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Tropical Medicine & International Health* 13: 476–486.
15. Chougourou C. Daniel (1)* ; Dellouh P. Lesline (1), Agbaka Alphonse (1), N'Guessan K. Raphael (2), Gbenou Joachim D. (3)., 2012: Toxicité et effets répulsifs de certaines huiles extraites des plantes locales Béninoises sur la mouche domestique *Musca domestica* L. (Diptera Muscidae). *Journal of Applied Biosciences* 55: 3953– 3961.

16. Corbel V., N'guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., Akogbeto M., Hougard J.M. & Rowland M. 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Actatropica* 101: 207–216.
17. Costantini C. & Awono-Ambene P. 2014. Exposure to disinfectants (soap or hydrogenperoxide) increases tolerance to permethrin in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malaria journal* 13: 296.
18. David J.-P., Boyer S., Mesneau A., Ball A., Ranson H. & Dauphin-Villemant C. 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect biochemistry and molecular biology* 36: 410–420.
19. David J.-P., Strode C., Vontas J., Nikou D., Vaughan A., Pignatelli P.M., Louis C., Hemingway J. & Ranson H. 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4080–4084.
20. Diabate A., Baldet T., Chandre F., Guiguemde R.T., Brengues C., Guillet P., Hemingway J. & Hougard J.M. 2002b. First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, west Africa. *Parassitologia* 44: 157–158.
21. Djègbè I., Agossa F.R., Jones C.M., Poupardin R., Cornelie S., Akogbéto M., Ranson H. & Corbel V. 2014. Molecular characterization of DDT resistance in *Anopheles gambiae* from Benin. *Parasites & vectors* 7: 1–9.
22. Djènontin A., Sahabi B.B. Nicolas M., Djènontin A., Sahabi B., Moiroux N., Henry MC., Boussari O., Chabi J., Osse R., Koudénoukpo S., Corbel V., Akogbéto M. et Chandre F., 2010: Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse -Tori district from Benin (West Africa): A pre intervention study. 3:83, 7p.
23. Djogbénou L., Noel V. & Agnew P. 2010. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malaria Journal* 9: 12.
24. Elissa N., Mouchet J., Rivière F., Meunier J.Y. & Yao K. 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* ss to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Annales-Societe Belge De MedecineTropicale*, pp. 291–291.
25. Fiacre R., Agossa, Virgile Gnanguenon, Rodrigue Anagonou, Roseric Azondekon, Nazaire Aïzoun, Arthur Sovil, Frédéric Oké-Agbo,

- Michel Sèzonlin, Martin C. Akogbéto, 2015 : Impact of Insecticide Resistance on the Effectiveness of Pyrethroid-Based Malaria Vectors Control Tools in Benin: Decreased Toxicity and Repellent Effect. doi:10.1371/journal.pone.0145207
26. Gnanguénon V., Agossa F.R., Badiro K., Govoetchan R., Anagonou R., Oke-Agbo F., Azondekon R., AgbanrinYoussof R., Attolou R., Tokponnon F.T., Aïkpon R., Ossè R. & Akogbetto M.C. 2015. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved.*Parasites & Vectors* 8.
 27. Hamon J. 1963a. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta): cycles d'agressivité et variations saisonnières. In: *Annales de la Société entomologique de France*, pp. 85–144.
 28. Hamon J. 1963b. L'importance des changements de comportement chez les insectes. *Bulletin of the World Health Organization* 29: 115–120.
 29. Magesa S.M., Wilkes T.J., Mnzava A.E.P., Njunwa K.J., Myamba J., Kivuyo M.D.P., Hill N., Lines J.D. & Curtis C.F. 1991. Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria Part 2. Effects on the malaria vector population. *Acta Tropica* 49: 97–108.
 30. Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Berge J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N. & Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology* 7: 179–184.
 31. MS. 2013. *Annuaire des statistiques sanitaires*. Archive Ministère de la Santé, pp 87.
 32. Müller P., Donnelly M.J. & Ranson H. 2007. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC genomics* 8: 36.
 33. N'Guessan R., Vincent C., Martin A. et Mark R., 2007: Reduced Efficacy of Insecticide-treated Nets and Indoor Residual Spraying for Malaria Control in a Pyrethroid Resistance Area, Benin. *Emerging Infectious Diseases*. www.cdc.gov/eid.vol.13, N°2, February 2007.
 34. Nkya T.E., Akhouayri I., Poupardin R., Batengana B., Mosha F., Magesa S., Kisinza W. & David J.-P. 2014. Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a case study in Tanzania. *Malaria Journal* 13: 28.
 35. Organisation Mondiale de la Santé, 2004 : Lutte contre les vecteurs du paludisme. WHO/CDS/WHOPES/2002. 5Rev.1.

36. Organisation Mondiale de la Sante1963 : Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides.*In* Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, *Sér. Rapp. Techn.* 265, p. 55–60.
37. Poupardin R., Reynaud S., Strode C., Ranson H., Vontas J. & David J.-P. 2008. Crossinductionof detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides inthe mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides.*Insect biochemistry and molecular biology* 38: 540–551.
38. Radhika W., Ankita R., Jasdeep K. S., Roopa S., Naim W., Sarita K., 2012: Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 152-155.
39. Raghavendra K., Barik T.K. & Adak T. 2010. Development of larval thermotoleranceand its impact on adult susceptibility to malathion insecticide and *Plasmodiumvivax* infection in *Anopheles stephensi*. *Parasitology research* 107: 1291–1297.
40. Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J. & Collins F.H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids.*Insect molecular biology* 9: 491–497.
41. Roman Pavela., 2009: Larvicidal property of essential oils against *Culexquinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*, 30(2), 311-315.
42. Sovi A., Azondékon R., Aïkpon R.Y., Govoétchan R., Tokponnon F., Agossa F., Salako A.S., Oké-Agbo F., Aholoukpè B., Okè M., Gbénou D., Massougbojji A. & Akogbéto M. 2013. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasites & Vectors* 6: 319.
43. Traboulsi, A., El-Haj, S., Tueni, M., Taoubi, K., Nader, N.B., Mrad, A., 2005 : Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera:Culicidae). *Pest.Manage.Sci.* 61, 597–604.
44. Vulule J.M., Beach R.F., Atieli F.K., Roberts J.M., Mount D.L. & Mwangi R.W. 1994.Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Medical and veterinaryentomology* 8: 71–75.

45. Yadouleton A., Martin T., Padonou G., Chandre F., Asidi A., Djogbénou L., Dabiré R., Aïkpon R., Boko M., Glitho I. & others. 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasite & Vectors* 4: 1–11.
46. Yadouleton A.W., Padonou G., Asidi A., Moiroux N., Bio-Banganna S., Corbel V., N'Guéssan R., Gbenou D., Yacoubou I., Gazard K. & Akogbéto M.C. 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal* 9: 83.
47. Yadouléton W.A., Padonou G.G., Assidi A., Nicolas M., Sahabib.B., Vincent C., Raphael N., Dina G., Imorou Y., Kinde G. et Martin A., 2010: Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar J* 2010, 9:83.