

<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

REDACTEURS	VERIFICATEURS	APPROBATEUR	DESTINATAIRES
Dr KOFFI Alphonsine	Cédric PENNETIER CHANDRE Fabrice DJENONTIN Armel FONTENILLE Didier BOYER Sébastien LABBO Rabiou MORLAIS Isabelle Maurice A ADJA Mahama TOURE	Participants au projet PALEVALUT ROGIER Christophe	Entomologistes
Date : 28/08/2013	Date : 06/09/2013	Date :	

**Objet :** Cette POS présente la collecte des échantillons, le mode opératoire des tests de sensibilité des anophèles aux insecticides selon le protocole OMS (WHO 1998a révisé 2013) ainsi que les techniques de détermination des mécanismes impliqués dans la résistance.

Application :

Le document est élaboré pour le personnel des structures de recherche opérationnelle en entomologie chargées de l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et de la détermination des mécanismes impliqués.

Documents associés :

Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes (WHO, 2313). WHO Library Cataloguing-in-Publication Data ISBN 978 92 4 150515 4

Insecticide resistance monitoring in disease vectors (Procedures and conditions for supply of test kits) WHO/CDS/CPE/PVC/2001.2

Historique des modifications:

Date	Version	Nature de la modification
28/08/2013	0	Premier draft
06/09/2013	1	Approuvé par WP1
04/11/2013	2	Mise en forme définitive

Sommaire

1	Introduction.....	3
2	Objectifs .....	3
2.1	Objectif de la procédure.....	3
3	Responsabilités.....	4
4	Echantillonnage des populations de moustiques et tests de sensibilité .....	4

1



Cette oeuvre, création, site ou texte est sous licence Creative Commons Attribution - Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International. Pour accéder à une copie de cette licence, merci de vous rendre à l'adresse suivante <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/> ou envoyez un courrier à Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.

<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

4.1	Matériel .....	4
4.1.1	Matériel d'échantillonnage .....	4
4.1.2	Matériel des tests de sensibilité .....	4
4.2	Echantillonnage pour les tests de sensibilité .....	5
4.2.1	Obtention des femelles de 2 à 3 jours à partir des larves .....	6
4.2.2	Obtention des femelles de 2 à 3 jours à partir de la faune résiduelle matinale. ....	6
4.3	Réalisation des tests de sensibilité .....	7
4.3.1	Le choix des insecticides .....	7
4.3.2	Déroulement du test .....	7
4.3.3	Interprétation des données .....	9
5	Caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance .....	9
5.1	Techniques de biologie moléculaire (PCR) .....	9
5.1.1	Matériel .....	9
5.1.2	Extraction de l'ADN total des moustiques adultes.....	10
5.1.3	PCR de diagnostic de la mutation <i>Kdr</i> .....	11
5.1.4	Détection de la mutation <i>Ace-1<sup>R</sup></i> « Glycine-Sérine ».....	12
5.1.5	Identification spécifique d' <i>An gambiae sl</i> .....	14
5.1.6	Electrophorèse en gel d'agarose.....	16
5.2	Technique d'analyses biochimiques .....	16
5.2.1	Matériel .....	16
5.2.2	Extraction enzymatique .....	17
5.2.3	Dosage des protéines totales .....	17
5.2.4	Dosage des estérases non spécifiques .....	18
5.2.5	Dosage des monooxygénases à cytochrome P450 .....	18
5.2.6	Dosage des glutathion S-transférases .....	18
5.3	Analyses statistiques des données .....	19
6	Références.....	19
7	ANNEXE 1 . Solutions et matériel technique pour la biologie moléculaire .....	21
8	ANNEXE 2 : Solutions Tampons pour la biochimie.....	23
9	ANNEXE 3 : Courbe étalon et interprétation des résultats de la biochimie .....	24
10	ANNEXE 4 : Produits Chimiques utilisés pour les essais biochimiques .....	28



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

## 1 Introduction

Les principales méthodes de lutte entomologique contre la transmission du paludisme par les anophèles vecteurs sont la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD) et la pulvérisation intra domiciliaire d'insecticides rémanents (PID). La mise en place de ces outils repose sur l'hypothèse que la majeure partie des anophèles responsables de la transmission piquent préférentiellement l'homme, la nuit, à l'intérieur des habitations et restent s'y reposer après la prise du repas sanguin.

L'efficacité opérationnelle de la lutte anti-vectorielle (LAV) repose sur la qualité du support traité avec de l'insecticide (MIILD ou PID), la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés et sur leur préférences comportementales. Toute modification de ces trois paramètres est susceptible de diminuer l'efficacité opérationnelle de la LAV. L'évaluation de ces paramètres après le déploiement des outils de LAV est donc indispensable.

Une telle évaluation pour être adéquate devra être composée du contrôle de la qualité des outils de lutte anti vectorielle mis en place (POS CQ MIILD-PID), de l'étude de la résistance des anophèles vecteurs aux insecticides utilisés (POS RES-VECT), de l'étude du comportement des anophèles vecteurs, ainsi que de l'évaluation du risque de transmission dans les zones couvertes (POS MoBe).

Dans certaines régions, les populations de vecteurs sont résistantes aux quatre classes d'insecticides (les organochlorés, les pyréthrinoïdes, les carbamates et les organophosphorés) utilisés en santé publique. Les principaux mécanismes décrits sont les mutations de cibles (Kdr et Ace1R) et une dégradation accrue par les enzymes de détoxification.

La présente POS concerne les méthodes utilisées pour diagnostiquer la résistance aux insecticides utilisés en santé et identifiés les mécanismes sous-jacents présents dans les populations.

## 2 Objectifs

Le but de la POS est de déterminer si les populations de moustiques des différentes zones d'études sont sensibles ou résistantes aux insecticides utilisés dans les MIILD et dans les pulvérisations intra-domiciliaires (PID) et d'identifier les mécanismes de résistance présents.

### 2.1 Objectif de la procédure

Dans cette procédure sont décrits :

1. la collecte des échantillons de moustiques devant servir à la réalisation des tests de sensibilité ainsi que leur entretien en insectarium afin de disposer des lots de moustiques homogènes du point de vue du sexe, de l'âge et du statut physiologique, et en effectif suffisant par espèce pour la réalisation des tests de sensibilité ;



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

2. le mode opératoire des tests en cylindres OMS pour la détermination de la sensibilité des populations de moustiques vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés dans les MIILD et dans les pulvérisations intra-domiciliaires (PID).
3. les techniques de biologie moléculaire et de biochimie permettant la détermination des mécanismes impliqués dans la résistance.

### 3 Responsabilités

Cette procédure implique la responsabilité :

- des auxiliaires/techniciens entomologistes ayant en charge la collecte des échantillons, l'élevage des moustiques en insectarium, la réalisation des tests de sensibilité, la saisie et la synthèse des résultats. Ces derniers sont sous la supervision des chercheurs entomologistes responsable de l'étude de la résistance des vecteurs aux insecticides.
- des techniciens de laboratoire/biologistes moléculaires pour les analyses de PCR et de biochimie, l'enregistrement des résultats sous les formats adéquats et leur analyse.

## 4 Echantillonnage des populations de moustiques et tests de sensibilité

### 4.1 Matériel

#### 4.1.1 Matériel d'échantillonnage

- Le matériel utilisé, pour la collecte des larves sur le terrain et l'élevage de celles-ci à l'insectarium, se compose de bacs à fond blanc, de louches de 120 mL, de pots de 1L, de pipettes, de tamis, tulles moustiquaires pour fermer les bacs, de croquettes pour chat (Friskies aliment complet) ou un mélange de TetraMin Aliment complet 2,5 g plus 20 g de TetraMin Aliment complet Junior finement moulu, d'eau sucrée à 10% ou eau miellée à 10% , de cage d'élevage, de gobelets jetables, de coton hydrophile, de bracelets élastiques.
- L'insectarium doit être maintenu à une température allant de 25 à 29 °C, avec une hygrométrie comprise entre 70 et 90 % pour les adultes. Il faut un thermo-hygromètre, un humidificateur et un radiateur ou une climatisation pour réguler la température.
- Pour éviter tout souci de contamination, suivre l'élevage des populations de terrain dans des pièces différentes de celles où sont élevées les souches de laboratoire.
- Le matériel pour la capture des moustiques adultes se compose d'aspirateur à bouche, de loupe binoculaire, de lampe torche, de piles, de gobelets jetables, de morceaux de tulle moustiquaire (5 cm x 5 cm), de coton hydrophile, de bracelets élastiques.

#### 4.1.2 Matériel des tests de sensibilité

- Les papiers imprégnés aux doses diagnostiques des insecticides (si les papiers sont commandés directement auprès du centre collaborateur OMS : Coordinator, Vector Control



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

Research Unit, School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia (Attn: Associate Professor Dr Zairi Jaal, Tel: 604-6574776; Fax: 604-6577200; e-mail: zairi@usm.my.)

- Sinon, il faudra les produits techniques [référence dans le paragraphe 4.3.1], de l'acétone, de l'huile de silicone, de l'huile d'olive, du papier Whatman (réf. 1002 917), ou à défaut, le Whatman N°1 (Chromatography paper 1 Chr N°. 3001 917) découpé au format 12 cm x 15 cm).
- Un Kit OMS comprenant un tube d'observation (vert), un tube pour le contact avec l'insecticide (rouge), un tiroir coulissant pour le passage des moustiques d'un tube à l'autre, 4 clips métalliques (argenté, cuivré) pour la fixation des papiers.
- Papiers imprégnés (tubes rouges) et feuilles blanches normales non imprégnées d'insecticide (tubes verts)
- Aspirateur à bouche,
- Eau sucrée à 10%
- Moustiques: le sexe, l'âge et le statut physiologique des moustiques ont un impact sur le résultat des tests. **Les tests seront réalisés sur des femelles adultes âgées de 2 à 3 jours après l'émergence** en insectarium. Ces femelles peuvent être obtenues soit par émergence de larves collectées sur le terrain soit par mise en élevage d'œufs issues de femelles sauvages gorgées (au moins 30 femelles gravides sont nécessaires afin d'avoir une bonne représentativité de la population sauvage).
- Les tests sont réalisés hors de l'insectarium, dans une pièce maintenue à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et avec une hygrométrie de  $80 \pm 10\%$ . Une température trop élevée entraîne une diminution de l'efficacité des pyréthrinoides pouvant conduire à une surestimation de la résistance.
- Matériel de laboratoire (gants, coton, miel, éthanol, eau de javel, essuie-tout, format de saisie de données)
- Matériel de conservation (tubes de Nunc, tubes Eppendorf, pince souple, silicagel, coton, congélateur moins-80 °C si possible)

#### 4.2 Echantillonnage pour les tests de sensibilité

Les tests de sensibilité sur les anophèles adultes nécessitent des lots de moustiques uniformes du point de vue du sexe, de l'âge, du développement ovarien et du contenu stomacal. Pour cela, il faut tester des femelles non gorgées âgées de 2 à 3 jours à partir de la date d'émergence. Ces femelles ne peuvent être obtenues qu'à partir d'un élevage fait, soit à partir d'un échantillon de larves d'anophèles récoltées sur le terrain, soit à partir d'une ponte de femelles d'*Anopheles gambiae* ou *An. funestus* récoltées en capture matinale par aspirateur dans les habitations humaines ou dans les abris extérieurs. Toutefois, cette dernière méthode ne doit être envisagée que lorsque les gîtes à anophèles sont rares et ne peuvent produire les quantités d'adultes nécessaires pour les tests de sensibilité. Il faut souligner que l'échantillonnage de *An. funestus* pour les tests de sensibilité est très difficile.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

#### 4.2.1 Obtention des femelles de 2 à 3 jours à partir des larves

- Dans les sites retenus dans le cadre de l'étude, faire des prospections larvaires qui permettront de repérer les gîtes spécifiques d'*An. gambiae s.l.* et effectuer un prélèvement larvaire par site d'étude.
- Effectuer les prélèvements si possible à différents endroits afin d'avoir une meilleure représentativité des populations d'*An. gambiae s.l.* par site d'étude.
- Réaliser une cartographie illustrative des gîtes larvaires prospectés à partir des coordonnées géographiques relevées par GPS.
- Prélever le maximum de larves possibles, quel que soit leur stade de développement, les trier par espèce (car il peut y avoir un mélange de stades pré-imaginaux de plusieurs genre : anophèles et culex) et les regrouper les larves de *An. gambiae* par stade de développement (stade 1-II et stade III-IV) dans les bacs à élevage. Les conserver de préférence dans l'eau du gîte. Dans ce dernier cas, prendre soin d'éliminer les prédateurs. Suivre l'élevage en insectarium. Garder en tête que c'est environ la moitié de la récolte qui servira pour les tests (*sex-ratio 50/50*). Pour réaliser les tests de sensibilité 100 femelles sont nécessaires par insecticide (4 tubes de 25 femelles).
- Faire donc l'estimation de la quantité de larves à récolter en fonction du nombre d'insecticide(s) à tester ainsi que les témoins afin de minimiser les sorties pour l'échantillonnage en terme de rapport coût/rendement.
- Nourrir les larves quotidiennement avec de petites pincées de la poudre d'aliment mentionné plus haut.
- Trier quotidiennement les nymphes et les mettre en cage pour obtenir des moustiques adultes.
- Nourrir les moustiques adultes en plaçant sur chaque cage un tampon de coton hydrophile imbibé d'eau sucrée ou d'eau miellée à 10%.
- Compter les femelles d'*An. gambiae s.l.* de 2 à 3 jours à l'aide d'un aspirateur à bouche à partir de la date d'émergence pour réaliser les tests insecticides.

#### 4.2.2 Obtention des femelles de 2 à 3 jours à partir de la faune résiduelle matinale.

- Procéder à des captures de la faune résiduelle à l'aide d'un aspirateur à bouche (ou électrique) muni d'un gobelet, de préférence le matin, dans les habitations humaines et dans les abris extérieurs.
- Ces captures doivent être faites concomitamment aux récoltes larvaires si le nombre de larves colletées n'est pas suffisant pour la réalisation des tests.
- Mettre les femelles gorgées, gravides et semi-gravides en cage avec un pondeur pour recueillir les œufs.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

Mettre ces pontes à éclosion dans les bacs pour obtenir des larves et suivre l'élevage à l'insectarium en vue de l'obtention des femelles soit (F0) soit (F1) en quantité suffisante pour la réalisation des tests de sensibilité.

### **4.3 Réalisation des tests de sensibilité**

#### **4.3.1 Le choix des insecticides**

Le choix des insecticides sera fonction des insecticides utilisés en santé publique. Dans le cadre de ce projet, il est souhaitable de tester les insecticides présents dans les MIILD actuellement disponibles et ceux des programmes de PID des pays impliqués dans le projet. Ainsi, les insecticides suivants seront testés:

- Pyréthrinoïdes : perméthrine 0.75 %, deltaméthrine 0,05 %, alpha-cyperméthrine 0,05 %.
- Carbamates : bendiocarb 0,1 %,
- Organophosphorés : chlorpyrifos-méthyl 0,4 %, pyrimiphos-méthyl 0,25 % ou 1%
- Organochloré : DDT 4 %
- Des tests additifs avec ces mêmes insecticides avec une pré-exposition aux synergistes (PBO, DEM et DEF) seront faits en vue de la détermination de l'implication de l'action des enzymes dans la résistance

Dans le cadre de ce travail, le CREC/IRD réseau ABC sera le fournisseur des papiers imprégnés à tous les pays impliqués dans le projet. Ceci permettra d'avoir les mêmes papiers mais également d'éviter les éventuels problèmes liés aux commandes.

#### **4.3.2 Déroulement du test**

Les tests de sensibilité seront faits selon le protocole WHOPES (WHO 1998 révisé 2013) suivant les étapes suivantes :

- Les feuilles blanches normales de rame de papier seront découpées suivant les dimensions de 12x15 cm ;
- Ces feuilles (12x15 cm) sont placées dans les tubes verts fixés, sur les tiroirs ;
- Les cages de moustiques à tester seront ramenées de l'insectarium au laboratoire où aura lieu le test ;
- 25 femelles de 2 à 3 jours sont introduites dans les tubes verts à l'aide de l'aspirateur. Pour chaque insecticide l'idéal est d'avoir 4 tubes de 25 soit 100 femelles ;
- Une fois le comptage terminé, les femelles sont placées au calme pendant une heure, sans eau sucrée ou eau miellée à 10%, avant l'exposition pour contrôler qu'il n'y ait pas de mortalité suite au transfert;
- Pendant l'heure d'observation après le comptage, les papiers imprégnés d'insecticide sont placés dans les tubes rouges. Pour éviter une éventuelle contamination, les papiers imprégnés d'insecticides seront manipulés avec des gants. Les tubes rouges témoins doivent



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

recevoir des papiers imprégnés du mélange d'huile-acétone seul sans insecticide. Les papiers témoins devront être placés dans les tubes avant les papiers contenant les insecticides ;

- Les tubes rouges sont fixés sur le tiroir, puis après ouverture de la tirette, les femelles sont soufflées délicatement mais le plus rapidement possible dans le tube rouge. Le tube vert est ensuite dévissé ;
- Pendant toute la durée d'exposition (1 heure), les tubes sont maintenus en position verticale ;
- Pour les pyréthrinoïdes, le nombre de moustiques assommés (KD) est noté à intervalle régulier au cours de l'exposition afin d'établir une droite de régression du %KD en fonction du temps (5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 mn) pendant l'heure de contact. Si à la fin de l'heure d'exposition le pourcentage de KD est inférieur à 80%, une dernière lecture est réalisée à 80 min (c'est à dire 20 min après le transfert dans les tube d'observation vert) ;
- Au bout d'une heure (d'exposition, les moustiques sont re-transférés dans les tubes d'observation et mis en observation pendant 24 heures avec un coton imbibé de d'eau sucrée ou eau miellée à 10% ;
- Après l'exposition, les papiers imprégnés sont replacés dans leur emballage (la face non imprégnée du papier est marquée d'une croix pour signifier chaque utilisation) et conservés au frigo (selon les insecticides voir les instructions sur l'emballage pour le temps de conservation). Le nombre d'utilisation ne doit pas excéder 6 fois ;
- La mortalité est déterminée 24 heures après l'exposition ;
- Pour la lecture de la mortalité, s'assurer que tous les moustiques survivants dans le tube sont posés sur les parois ou sur le toit du tube. Dévisser délicatement le tube et le poser sur la paillasse et faire le décompte des moustiques morts sur le tiroir. Revisser le tube sur le tiroir après avoir pris soin de conserver individuellement les morts dans des tubes Eppendorf avec du silicagel. Mettre le tube contenant les moustiques survivant à -20 °C pour les assommer et faciliter le comptage et la conservation (individuellement dans des tubes Eppendorf avec du silicagel). Procéder à la même opération pour l'ensemble des répliques par insecticide pour avoir le total des morts et des survivants ;
- Le nettoyage du matériel après le test : Les clips métalliques sont nettoyés par trempage dans l'éthanol. Les tubes, les tiroirs et les couvercles sont trempés au moins 24 heures dans une solution nettoyante en pensant à séparer tubes rouges et tubes verts dans 2 bacs différents. Au bout de 24 heures le matériel est rincé, séché puis nettoyé une dernière fois avec de l'éthanol ;
- Les moustiques exposés à l'insecticide ne peuvent pas être utilisés pour les tests biochimiques, par contre ils sont utilisés pour la PCR. Les différents lots (morts/ survivants) seront étiquetés en fonction du site, la date du test, l'espèce et l'insecticide puis conservés à - 20 °C ;





<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

- Les témoins **vivants de moins 5 jours** peuvent être conservés dans des tubes de Nunc à – 70°C (sans silicagel) pour les essais biochimiques environ (50-100 moustiques par tube) étiquetés en fonction du site, la date du test et l'espèce.

#### 4.3.3 Interprétation des données

- Le test n'est pas valide si la mortalité des témoins est supérieure à 20%. Cette valeur est toutefois très élevée et dans la mesure du possible, il est recommandé d'avoir moins de 10% de mortalité chez les témoins.
- Calcul de la mortalité observée par insecticide = (total des moustiques morts)/ (total des moustiques testés par insecticide) x 100
- Si la mortalité des Témoins est supérieure à 5%, il est nécessaire de corriger la mortalité observée chez les traités par la formule d'Abbott:  

$$\% \text{ Mortalité corrigée} = (\% \text{Mort. observée} - \% \text{Mort. Témoin}) / (100 - \% \text{Mort. Témoin}) \times 100$$
- Selon les recommandations de l'OMS l'interprétation des résultats sont les suivantes:
  - 98-100% Mortalité: Sensible
  - 90-97% Mortalité: Résistance possible à confirmer
  - < 90% Mortalité: Résistance

Pourcentage de moustiques KD en fonction du temps

Le pourcentage de moustiques KD en fonction du temps est analysé selon un modèle log-probit ou sur papier log-probit pour détecter les Kd50 et Kd95 qui pour certaines zones apporteront plus d'informations que la mortalité seule car le Kd est un indicateur plus précoce de l'apparition de résistance.

## 5 Caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance

La caractérisation des mécanismes de résistance aux insecticides se fera par des techniques de biologie moléculaire (PCR) et de biochimie afin de détecter la présence de résistance par modification de cible et par voie métabolique.

### 5.1 Techniques de biologie moléculaire (PCR)

Elles nécessitent différentes étapes dont l'extraction de l'ADN, l'amplification et la révélation des produits amplifiés sur gel.

#### 5.1.1 Matériel

Voir en annexe 1 (A , B, C )



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

### 5.1.2 Extraction de l'ADN total des moustiques adultes

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN à partir de moustiques sont disponibles. Nous suggérons en particulier le protocole de Collins (1987) modifié par Colin et Brengues (LIN-Montpellier), ou celui de Instagene Matrix®. Cette étape est fondamentale car toutes les manipulations ultérieures dépendent de la quantité et de la qualité d'ADN extrait.

#### 5.1.2.1 Protocole de Collins modifié par Colin et Brengues

La méthode consiste à broyer individuellement les moustiques dans une solution de tampon (CTAB 2%) permettant l'éclatement des membranes cellulaires. Après une incubation au bain-marie pour détruire les enzymes thermolabiles, l'ADN est séparé des débris cellulaires par du chloroforme. L'ADN ainsi obtenu est précipité dans de l'alcool (isopropanol et éthanol), séché puis suspendu dans 20 µl d'eau pure stérile pendant 24 heures. Cette solution d'ADN est ensuite diluée au quinzième pour la réalisation des PCR pour la détection des mutations des gènes de résistance et pour les identifications spécifiques du complexe d'espèce.

Ci-dessous le détail des étapes de l'extraction :

- Pour pallier à toute contamination, il faut nettoyer le matériel et la paillasse à la javel puis l'alcool avant et après toutes utilisations. Travailler avec des gants ; les embouts et tubes Eppendorf stérilisés à l'étuve à 100°C pendant 1heure ;
- Mettre les moustiques individuellement dans les tubes Eppendorf (nettoyer la pince d'un moustique à l'autre);
- Broyer chaque moustique dans 200 µl de CTAB 2% (1 cône/tube, 1 piston/tube);
- Mettre au bain-marie 65° C pendant 5mn ;
- Ajouter 200 µl de chloroforme (1 cône/tube). Mélanger par inversion ;
- Centrifuger 5mn à 12 000 rpm, à température ambiante ;
- Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube (1 cône/tube, jeter le reste) ;
- Ajouter 200µl d'isopropanol sur ce surnageant (1 cône/tube). Bien mélanger par inversion ;
- Centrifuger 15 mn à 12 000 rpm à température ambiante;
- Vider l'isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 µl d'éthanol 70% au culot (1 cône/tube);
- Centrifuger 5mn à 12000 rpm, à température ambiante ;
- Vider l'éthanol ;
- Sécher le culot pendant 5mn maximum au speed-vac. A défaut faites le pendant 15-20 mn à l'étuve à 50° C ;



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

- Reprendre dans 20 µl d'eau pure stérile. Ne pas vortexer. Laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une journée).

#### 5.1.2.2 Protocole Instagene Matrix®

- Mettre 2 pattes de moustique dans un tube Treff 1.5ml
- Ajouter 20µl de PBS 1X
- Broyer à l'aide d'une bille de 3 mm à 30 vibrations par seconde pendant 1min 30sec
- Ajouter 200 µl d'Instagene, vortexer 10 sec à grande vitesse
- Incuber dans un bain marie à 56°C pendant 30 min
- Vortexer pendant 10 sec
- Incuber à 100°C pendant 8 min
- Vortexer pendant 10 sec
- Centrifuger à 12000 tr /min pendant 3 min
- Récupérer le surnageant dans un autre tube (extrait d'ADN) et jeter le culot.

#### 5.1.3 PCR de diagnostic de la mutation *Kdr*

La résistance de type *Kdr* (knockdown résistance) est due à une mutation ponctuelle du gène codant pour canal sodium voltage dépendant (CNaVdp). Cette mutation entraîne le remplacement d'un acide aminé, la leucine par la phénylalanine (**L1014F** ; Martinez-Torres *et al.*, 1998) ou de la leucine par la sérine (**L104S** ; Ranson *et al.*, 2000) chez *An. gambiae* résistant aux pyréthriinoïdes et au DDT.

Plusieurs tests de diagnostic de la mutation *Kdr* chez *An. gambiae* ont été définis (Martinez-Torres *et al.*, 1998, Hot Ligation Oligonucleotide Assay (HOLA) de Lynd *et al.*, 2005). Nous présentons celle de Martinez-Torres *et al.*, 1998.

Elle est basée sur l'amplification spécifique des allèles sensible et résistant. Deux oligonucléotides Agd1 et Agd2 asymétriques par rapport au fragment d'ADN concerné par la mutation servent d'amorces pour amplifier une séquence commune de 293 paires de bases chez tous les moustiques *An. gambiae*. Deux autres oligonucléotides spécifiques, Agd3 et Agd4, amplifient respectivement la séquence résistante de 195 paires de bases et la séquence sensible de 137 paires de bases. Ces trois bandes de tailles différentes sont facilement résolues sur gel d'agarose à 1,5% et permettent ainsi la détermination aisée du génotype de chaque moustique. La lecture du résultat est faite à l'ultraviolet.

Ci-dessous le détail des étapes de la PCR *Kdr*:

#### Composition du prémix :

Concentration initiale	Concentration finale
Tampon d'enzyme 10X	1 X final
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM final
dNTP 25 mM	0,1 mM final
Agd1	40 pmoles
Agd2	40 pmoles



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

Agd3	20 pmoles (primer qui contient la mutation Kdr)
Agd4	20 pmoles (ne contient pas la mutation)
Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l)	1,5 U
DNA extraction totale	4 $\mu$ l d'une dilution au 1/15
H2O (sterile)	QSP 25 $\mu$ l

**Conditions de la réaction :**

1 cycle :	94°C	3 mn
	48°C	30 s
	72°C	30 s
45 cycles :	94°C	30 s
	48°C	30 s
	72°C	30 s

Garder les tubes à 4°C.

Préparer un gel d'agarose à 1,5 % dans du TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X

Ajouter 6  $\mu$ l d' Ethidium Bromide (10mg/ml) pour 100 ml de gel

Faire migrer 15 à 18 $\mu$ l de produit PCR avec 2  $\mu$ l de Bleu de Bromophénol

Visualiser le résultat aux UV.

Trois génotypes sont à prendre en compte dans l'interprétation des données :

- moustique homozygote résistant (RR) avec les bandes de 293 pb et 195 pb ;
- moustique hétérozygote sensible (RS) avec les bandes de 293 pb, 195 pb et 137 pb ;
- moustique homozygote sensible (SS) avec les bandes de 293 pb et 137 pb.

Il doit toujours y avoir la bande commune à 293 pb amplifiée avec Agd1 et Agd2 pour valider les résultats. Généralement dNTP, et primers sont dilués au 1/10 pour avoir des volumes corrects à pipeter.

NB : Une seconde PCR avec le primer spécifique de la mutation L1014S doit être effectuée sur le même moustique

#### **5.1.4 Détection de la mutation Ace-1<sup>R</sup> « Glycine-Sérine »**

L'enzyme Acetylcholinestérase 1 (AChE-1) est la cible des carbamates et des organophosphorés chez *An gambiae*. La résistance à ces insecticides provient de la modification du gène Ace-1 par une mutation ponctuelle qui induit la production d'une AChE-1 insensible dans laquelle la glycine est remplacée par une sérine (la mutation G119S) (Weill *et al.*, 2003).

La détection de la mutation Ace-1<sup>R</sup> se fait selon le protocole de Weill *et al.*, (2004) basé sur une PCR-RFLP. Ce test consiste à amplifier un fragment d'ADN d'environ 541 pb à l'aide de deux oligonucléotides (Ex3Agdir et Ex3Agrev). Cette séquence est ensuite digérée par l'enzyme de restriction Alu I et révélée sur gel d'agarose à 2% après lecture à l'ultraviolet.

Ci-dessous le détail des étapes de la PCR :



PROCEDURE	Réf. POS RES-VECT
POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides	Version : 2
	Date : 04/11/2013

### Composition du "prémix" de PCR:

Concentration initiale	Concentration finale
Tampon de Taq 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM
dNTP 25 mM	0,2 mM
Primer Ex3AGdir	10 pmol
Primer Ex3AGrev	10 pmol
Taq DNA polymerase 5 UI/μl	0,25 UI
Eau stérile	QSP 21 μl
Total	21 μl

### Conditions d'amplification

1 <sup>er</sup> cycle	94°C 3mn
	62°C 30s
	72°C 30s
	94°C 30s
35 cycles	62°C 30s
	72°C 30s
Extension fin	72°C 5mn
Garder les tubes à 4°C.	

### Composition du "prémix" de la digestion enzymatique

Concentration initiale	Concentration finale
Tampon de l'enzyme 10X	1X
BSA 10 mg/ml	0,1 mg/ml
Alu I 10 U/μl	2,5 U
Eau stérile	QSP 20 μl
Total	20 μl

Incuber à 37°C pendant 3 heures (10 μl du produit de PCR + 10 μl du prémix).

- Faire migrer à 140 V pendant 1h 15 mn, 10 μl du produit de la digestion avec 2 μl de Bleu de bromophénol sur un gel d'agarose 2% dans du TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X ;
- Visualiser le résultat sous la lumière UV.

L'interprétation porte sur les bandes suivantes :

- une bande représentant la séquence commune de 138 pb ;
- une bande de 150 pb, résultant de la digestion du gène muté ;
- une bande de 253 pb qui est aussi le résultat de la digestion du gène muté ;
- une bande de 403 pb qui représente la séquence du gène sensible.

On obtient donc :

- chez les moustiques homozygotes sensibles (SS) un fragment de 403 pb et 138Pb ;
- Chez les moustiques homozygotes résistants (RR) 3 fragments de 138 pb, 150 pb et 253 pb ;



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

- Chez Les moustiques hétérozygotes résistants (RS) 4 fragments de 138Pb, 150 pb, 253 pb et 403 pb.

NB : dans certaines populations ce gène est dupliqué. Il n'y a cependant pas de test diagnostic de cette duplication

### **5.1.5 Identification spécifique d'*An gambiae* sl**

#### **Identification des espèces composant le complexe *An. gambiae* selon le protocole de Scott et al. (1993)**

L'identification des espèces composant le complexe *An. gambiae* est faite selon le protocole de Scott *et al.* (1993) en se servant de quatre amorces qui sont : UN, AG, AA, AM. UN est l'amorce universelle pour toutes les espèces du complexe. AG amplifie un fragment spécifique chez *Anopheles gambiae* s.s. AA amplifie un fragment spécifique chez *Anopheles arabiensis* et AM réalise l'amplification spécifique chez *Anopheles melas*.

Ci-dessous le détail des étapes de la PCR :

#### **Composition du Prémix :**

<b>Concentration initiale</b>	<b>Concentration finale</b>
Enzyme buffer 10X	1 X final
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 mM final
dNTP 25mM	0,2 mM chacun final
Primer AG ( <i>gambiae</i> )	10 pmoles
Primer AA ( <i>arabiensis</i> )	10 pmoles
Primer AM ( <i>melas</i> )	10 pmoles
Primer UN	10 pmoles
Taq DNA Polymerase 5 UI/μl	1,5 U
DNA -Total extraction	4 μl d'une dilution au 1/15
H <sub>2</sub> O (stérile)	QSP 25 μl

#### **Conditions de la réaction :**

1 cycle :	94°C	3 mn
	50°C	30 s
	72°C	30 s
40 cycles :	94°C	30 s
	50°C	30 s
	72°C	30 s

Conserver les tubes à 4°C.

Préparer un gel d'agarose à 1,5 % dans le TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X

Ajouter 6 μl d'Ethidium Bromide (10mg/ml) pour 100 ml de gel d'agarose

faire migrer 10 μl de produit PCR avec 1 μl de Bromophenol Blue

Visualiser le résultat aux UV.



PROCEDURE	Réf. POS RES-VECT
POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides	Version : 2
	Date : 04/11/2013

**Résultats :**

<i>An. melas</i>	462 bp
<i>An gambiae</i>	386 bp
<i>An arabiensis</i>	313 bp

### **Identification des formes moléculaire d'*An gambiae ss***

L'identification des formes moléculaire d'*An gambiae ss* se fait avec quatre amorces (R3, R5, Mopti int et B/S int) selon le protocole de Favia *et al.*, (2001). Le couple d'amorces R3/R5 amplifie un fragment standard d'environ 1300 paires de bases (pb). A ce premier fragment, s'ajoute le fragment de 727 pb amplifié par le couple d'amorces Mopti int et B/S int chez les individus de forme M alors que ces amorces amplifient un fragment de 475 pb chez les individus de forme S. Ces deux formes moléculaire correspondent respectivement à *Anopheles coluzzii* et *An. gambiae* Giles (Coetzee *et al.*, 2013).

Ci-dessous le détail des étapes de la PCR :

Concentration initiale	Concentration finale
Tampon d'enzyme	1 X final
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,5 mM final
dNTP 25 mM	0,1 mM final
R3	50 pmoles
R5	50 pmoles
Mop Int	40 pmoles
B/S int	25 pmoles
Taq DNA Polymerase	0,5 U (essayer d'abord avec 1 unité)
DNA (extraction totale)	4 µl d'une dilution au 1/50
H <sub>2</sub> O (stérile)	QSP 25 µl

### **Conditions de la réaction :**

1cycle :	94°C	10 mn
	63°C	30 s
	72°C	30 s
24 cycles :	94°C	30 s
	63°C	30 s
	72°C	30 s
Extension fin.	72°	7 mn

Garder les tubes à 4°C.

Préparer un gel d'agarose à 1% dans du TBE 1X en ajoutant du Bromure d'Ethidium (6 µl pour 100 ml de gel).

- moustique de forme "S" avec les bandes de 475 pb et 1 300 pb ;
- moustique de forme "M" avec les bandes de 727 pb et 1 300 pb.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

NB : l'identification des espèces du groupe *An. funestus* pourra également être fait à l'aide de protocole spécifique à cette espèce.

### 5.1.6 Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode qui permet de séparer des fragments d'ADN ayant des tailles différentes. En agissant sur la concentration d'agarose, on peut augmenter le pouvoir de résolution. Ainsi, plus l'espace entre les bandes est grand, plus la concentration d'agarose devra être élevée.

- Peser et dissoudre dans un erlenmeyer une quantité donnée d'agarose en poudre (correspondant à la concentration du gel à préparer) dans du tampon TBE 1X ;
- Préparer la cuve du gel et placer les peignes ;
- Porter à ébullition le mélange jusqu'à obtenir un liquide homogène et limpide ;
- Plonger l'erlenmeyer dans un bain d'eau pour refroidir ;
- Rajouter au mélange avant qu'il ne se solidifie du bromure d'éthidium (BET) (6 µl pour 100 ml de gel) qui complexera plus tard avec les fragments d'ADN amplifiés (porter des gants avant de manipuler le BET) ;
- Dès que le gel est à une température acceptable, couler le et attendre qu'il se solidifie comme il faut avant de l'utiliser pour charger le produit de PCR mélangé à du bleu de bromophénol (2 µl).

Ce gel est ensuite soumis à un courant électrique (140 volts) pendant un temps donné dans une cuve de migration contenant du tampon TBE 1X. L'ADN, étant chargé négativement, migre de l'électrode négative vers l'électrode positive de la cuve. Cette migration est d'autant plus rapide que l'ADN est de petite taille. Le complexe ADN-bromure d'éthidium est ensuite visualisé sous forme de bandes avec l'ultraviolet. Selon la position de ces bandes, on détermine le génotype de l'individu au locus amplifié.

## 5.2 Technique d'analyses biochimiques

L'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des insecticides et qui sont à la base de la résistance métabolique sera dosée selon le protocole de WHO (1998b). Ces enzymes sont les estérases, les mono-oxygénases à cytochrome P450 et les glutathions S-tranfêrases. La mesure de l'activité de ces enzymes passe par l'extraction puis le dosage à travers des substrats spécifiques à chaque type d'enzyme.

### 5.2.1 Matériel

- Spectrophotomètre pour microplaque permettant la lecture en cinétique, équipé des filtres (UV), 340, 420, 550, 590, 630 nm et fourni avec le logiciel approprié pour la lecture des activités enzymatique (logiciel Kc4).
- centrifugeuse réfrigérée de préférence
- microplaques 96 puits à fond plat qualité standard





<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

- Pipette multicanaux, réservoirs de réactif, cônes, tubes Eppendorf de 0.5 ml, piston pour broyage
- Annexes 2 à 4

### 5.2.2 Extraction enzymatique

Les moustiques utilisés pour les analyses biochimiques sont les femelles âgées de 2 à 4 jours, non gorgées issues soit de l'élevage des larves collectées dans les différents sites d'étude. Ils doivent être, d'une part de la souche "Kisumu" ou d'une autre souche locale sensible, et d'autre part les témoins survivants des tests de sensibilité conservés à -80 °C. Ces moustiques ne doivent pas avoir été exposés à un insecticide.

- Les enzymes se dégradent rapidement à température ambiante, il faut toujours travailler sur de la glace.
- Les extraits enzymatiques seront obtenus par broyage individuellement des moustiques à froid dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml contenant 200 µl d'eau distillée.
- Centrifuger le broyat à 14 000 r.p.m. pendant 2 minutes. Puis recueillir le surnageant dans un autre tube.
- Répartir dans des microplaques, à raison de deux répliques par moustique dans deux puits contigus les extraits enzymatiques. La quantité de surnageant prélevée est en fonction du système enzymatique à doser : 20 µl pour le dosage des monooxygénases à cytochrome P450, 10 µl pour les dosages des protéines totales, des estérases non spécifiques, et des glutathion S-transférases.
- Sur toutes les microplaques, remplir les deux derniers puits contigus d'eau distillée pour le bruit de fond. Ainsi, une microplaque de 96 puits permet l'analyse de 47 moustiques en deux répliques.

Les différentes densités optiques (DO) sont lues au spectrophotomètre à des longueurs d'ondes définies en fonction du système enzymatique. Les colorations obtenues après chaque réaction sont visibles à l'œil nu.

### 5.2.3 Dosage des protéines totales

- Dans une microplaque contenant 10 µl de broyat par puits en deux répliques.
- Ajouter 290 µl de solution: Coomassie Plus Protein Assay Reagent dilué de moitié dans l'eau distillée (1 vol. de Protein Reagent pour 1 volume d'eau). Préparer le volume exact de produit nécessaire.
- Maintenir la plaque 5 minutes à 25°C ou température ambiante.
- Lire en point final à 590 nm la densité optique (DO) du complexe ionique formé par les protéines et le colorant "Coomassie Plus Protein Assay Reagent". La quantité de protéines totales par moustique est estimée à partir de courbe étalon selon l'équation:  $DO = Ax + B$  ; où  $x$  est la quantité de protéines dans le puits,  $A$  et  $B$  sont des constantes, respectivement égales à 123,0 et 0,9941, la DO est lue sur le spectrophotomètre.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

Cette quantité de protéines totales servira de base pour l'estimation de l'activité de chaque système enzymatique (des estérases non spécifiques, du glutathion-S-transférase et des mono-oxygénases à cytochrome P450).

#### 5.2.4 Dosage des estérases non spécifiques

- Dans une microplaque contenant 10 µl de broyat en deux répliques.
- Ajouter 90 µl de Tampon 1% Triton Phosphate Saline (PBS) pH 6.5 dans chaque puits.
- Incuber 10 minutes à 25°C ou température ambiante.
- Ajouter 100 µl de solution: 500 µl d'alpha-Naphthyl acétate 0.3M (ou bêta-Naphthyl acétate) + 2.5 ml Tampon 1% Triton PBS pH 6.5 + 7ml dH<sub>2</sub>O.
- Incuber 30 minutes à 25°C.
- Ajouter 100 µl de solution: 0.008 gr de Fast Garnett Salt (FGBC) dissout dans 10 ml d'eau distillée.
- Incuber la plaque 10 minutes à 25°C ou température ambiante avec un couvercle.
- Lire en point final à 550 nm les DO.

A partir de l'équation de la droite étalon «  $DO = Ax + B$  » et de la quantité de protéines totales par moustique, déterminer l'activité estérasique de chaque moustique en µmol d'α ou bêta - naphthol produit/min/mg protéine.

#### 5.2.5 Dosage des monooxygénases à cytochrome P450

- Dans une microplaque contenant 20 µl de broyat en deux répliques.
- Ajouter 80 µl de tampon Potassium Phosphate (KHPO<sub>4</sub>) 0.0625M pH 7.2 dans chaque puits.
- Ajouter 200 µl de solution: 0.010 gr 3,3',5,5' Tétraméthyl Benzidine (TMBZ) dissout dans 5 ml de Méthanol (écraser le TMBZ avec la spatule) puis ajouter 15 ml de Tampon Sodium Acétate (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) 0.25M pH 5.0 dans chaque puits.
- Ajouter 25 µl de 3% peroxyde d'hydrogène dans chaque puits.
- Incuber 30 minutes à température ambiante avec un couvercle.
- Lire en point final à 630 nm les DO des puits.

A partir de l'équation de la droite étalon «  $DO = Ax + B$  » et de la quantité de protéines totales, déterminer l'activité oxydasique de chaque moustique.

#### 5.2.6 Dosage des glutathion S-transférases

L'activité des GST est déterminée grâce à la vitesse de conjugaison du glutathion sous forme réduite avec le substrat 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB).

- Dans une microplaque contenant 10 µl de broyat en deux répliques.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

- Ajouter 200 µl de solution: 0.060 gr glutathion sous forme réduit (GSH) dans 20 ml de Tampon Sodium Phosphate 0.1M pH 6.5 + 0.013 gr de CDNB (1-chloro-2,4-Dinitrobenzene) préalablement et totalement dissous dans 1 ml de Méthanol (écraser avec la spatule).
- Lire en cinétique à 340 nm pendant 5 minutes.

La concentration en GSH conjuguées est obtenue selon l'équation :  $C = DO / min / \epsilon.L$  (2). Le nombre de moles de GSH conjuguées (X en µmol) par puits de 210 µl est déterminé à partir de (2). On a donc obtenu :  $X = C \times 210$ . Cette quantité de moles de GSH conjuguées est rapportée à la quantité de protéines totales par puits, c'est-à-dire pour 10 µl de broyat. Finalement, l'activité GST pour chaque moustique en µmol de GSH conjuguées/min/mg de protéine est donnée par la formule :  $[(\text{milliDO} / \text{minute} \times 0,21) / (5,76 \times 1000)] / \text{mg de protéine dans } 10 \mu\text{l de broyat}$ .

NB : Pour l'ensemble de ces dosages, il est très important de refaire régulièrement la courbe étalon car les valeurs de A et B peuvent varier selon les conditions expérimentales et le spectrophotomètre.

### 5.3 Analyses statistiques des données

Les génotypes obtenus pour la PCR *kdr* sont analysés à l'aide du logiciel Genepop (version 3.2a) de Raymond et Rousset (1995) pour calculer les fréquences des allèles, comparer les populations entre elles, la différence des fréquences génotypiques entre populations.

Pour chaque système enzymatique, l'activité moyenne par population est calculée et comparée à celle de la souche sensible de référence "Kisumu" à l'aide du test de comparaison non-paramétrique de Kruskal-Wallis (plusieurs populations) ou de Mann-Whitney (deux populations)

## 6 Références

Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly AB & Besansky NJ. 2013. *Anopheles coluzzii and Anopheles amharicus, new members of the Anopheles gambiae complex*; *Zootaxa* **3619** (3): 246–274

Collins Collins F.H., Mendez M.A., Rasmussen M.O., Mehaffey P.C., Besansky N.J. & Finnerty V., 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37**:37-41.

Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Siden-Kiamos I., Louis C., 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Mol. Biol.*, **10**:19-23.

Lynd A., Ranson H., McCall P.J., Randle N.P, Black IV W.C., Walker E.D., Donnelly M.J., 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (*kdr*) detection in *Anopheles gambiae*. *Malar. J.*, **4**:16.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Berge J.B., Devonshire A.L., 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.. *Ins. Mol. Biol.*, **7(2)**:179-84.

Raymond M., Rousset F., 1995. Genepop (version 1.2). Population genetics software for exact tests and eucumenicism. *J. Heredity*, **86**:248-249.

Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH 2000; Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* s.s. associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Ins Mol Biol*, **9**:491-497.

Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H., 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerization chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**:520-29.

Weil 2003 Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N. *et al.*, 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, **423**: 136-137.

Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M., 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.*, **13(1)**:1-7.

WHO, 2013. **Test procedures** for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data ISBN 978 92 4 150515 4.

WHO, 1998a. Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. *WHO/CDS/CPC/MAL/1998.12*.

WHO, 1998b. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). *WHO/CDS/CPC/MAL/1998.6*.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

## **7 ANNEXE 1 . Solutions et matériel technique pour la biologie moléculaire**

### **1A) Solutions et produits de biologie moléculaire**

CTAB 2%, pour 1 litre de solution, prélever :

- 100 ml de Tris (pH 8) 1M
- 20 ml de EDTA 0,5 M
- 20 g de CTAB
- QSP 1 litre H<sub>2</sub>O (distillée)

TBE 10X, pour 1 litre de tampon, prélever :

- 162 g de Tris
- 27,5 g d'Acide borique
- 9,5 g de EDTA
- QSP 1 litre H<sub>2</sub>O (distillée)

Ethanol 70%, pour 100 ml de solution, mélanger:

- 100 ml d'Ethanol Absolu (95°)
- 19,59 ml H<sub>2</sub>O

### **1B) Liste du matériel technique pour la biologie moléculaire**

- Agarose
- Micro-onde
- Analyseur de gel électrophorèse
- Bain-marie
- Balance électronique
- Bleu de bromophénol
- Bromure d'éthidium
- Broyeur électrique et pistons broyeurs
- Centrifugeuse réfrigérée à vitesse programmable
- Chloroforme, isopropanol, éthanol 70%, TBE 1X,
- CTAB 2%
- Générateur + Cuve pour électrophorèse
- Eau pure stérile
- Enzyme de digestion Alu I
- Enzyme Taq (Thermus aquaticus)
- Erlenmeyer
- Etuve
- Hotte
- Micropipettes 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Papier essuie-tout
- Peignes à 20 puits



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

- Pince souple
- Pointes pour micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Portoirs
- Portoirs pour les peignes
- Primers
- SmartLadder
- TBE (Tris/Borate/EDTA).
- Thermocycleur
- Tubes eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml
- Vortex

### **1C) Séquences des différents primers utilisés en PCR**

Pour PCR *Kdr* :

Agd1	5' ATAGATTCCCCGACCATG 3'
Agd2	5' AGACAAGGATGATGAACC 3'
Agd3	5' AATTTGCATTACTTACGACA 3'
Agd4	5' CTGTAGTGATAGGAAATTTA 3'

Pour PCR *Ace1R* :

Ex3AGdir :	5' GATCGTGGACACCGTGTTTCG 3'
Ex3AGrev :	5' AGGATGGCCCGCTGGAACAG 3'

Pour PCR espèces :

AG ( <i>gambiae</i> )	5' CTGGTTTGGTCGGCACGTTT 3'
AA ( <i>arabensis</i> )	5' AAGTGTCCTTCTCCATCCTA 3'
AM ( <i>melas</i> )	5' GTGACCAACCCACTCCCTTGA 3'
UN ( <i>universel</i> )	5' GTGTGCCCTTCTCGATGT 3'
Mop/int	5' GCC-CCT-TCC-TCG-ATG-GCA-T 3'
BS/int	5' ACC-AAG-ATG-GTT-CGT-TGC 3'
RS	5' GCC-AAT-CCG-AGC-TGA-TAG-CGC 3'
R3	5' CGA-ATT-CTA-GGG-AGC-TCC-AG 3'



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

## 8 ANNEXE 2 : Solutions Tampons pour la biochimie

### 1. Solutions Mères

Sodium Phosphate dibasique (disodium Phosphate)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M: 14.2 gr dans 1 litre  $\text{H}_2\text{O}$

Sodium Phosphate monobasique (monosodium Phosphate)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M : 13.8 gr dans 1 litre  $\text{H}_2\text{O}$

Potassium Phosphate dibasique  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.0625M: 3.57 gr dans 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Potassium Phosphate monobasique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0625M: 2.12 gr dans 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$

### 2. Sodium Phosphate 0.1M pH 6.5 (GST)

Ajouter  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M à n'importe quel volume de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M jusqu'à pH 6.5

### 3. Potassium Phosphate 0.0625M pH 7.2 (oxydases)

Ajouter  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0625M à n'importe quel volume de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.0625M jusqu'à pH 7.2

### 4. Sodium Acetate 0.25M pH 5.0 (oxydases)

Diluer 25 ml de Sodium Acetate 3M pH 5.0 avec 275 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , et ajuster à pH 5.0 avec HCl si nécessaire.

### 5. Tampon Phosphate Saline plus 1% Triton X100 pH 6.5 (Estérases)

dans 800 ml d'eau distillée, dissoudre:

8 gr Sodium Chloride ( $\text{NaCl}$ )

0.2 gr Potassium Chloride ( $\text{KCl}$ )

1.44 gr Disodium Phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.24 gr Monosodium Phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

Ajuster à pH 6.5 avec HCl

Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1 litre et ajouter 10 ml Triton

Tous les tampons 1 à 5 peuvent être stockés à température ambiante plusieurs mois

### 6. Autres solutions à conserver à 4°C

- Alpha- ou Beta-Naphthyl Acétate 0,06M : 0,0559 gr dans 5 ml d'éthanol, peroxyde d'hydrogène.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

## 9 ANNEXE 3 : Courbe étalon et interprétation des résultats de la biochimie

### Courbe étalon pour les protéines totales et interprétation des données

Le dosage des protéines totales nécessite un étalonnage de base à partir d'une solution de Bovine Serum Albumine (BSA). Cet étalonnage permet de déterminer des quantités précises de protéines et de tracer une courbe d'étalon enregistrée par le logiciel et par rapport à laquelle, les protéines totales de chaque moustique testé est ajustée et estimée.

- Solution mère de Bovine Serum Albumine (BSA) à 2mg/ml
- Préparer une série de dilutions du BSA dans l'eau distillée
  - 0.50 mg/ml = 250 µl BSA + 750 µl H<sub>2</sub>O
  - 0.25 mg/ml = 500 µl 0.50 mg/ml + 500 µl H<sub>2</sub>O
  - 0.10 mg/ml = 400 µl 0.25 mg/ml + 600 µl H<sub>2</sub>O
  - 0.05 mg/ml = 500 µl 0.10 mg/ml + 500 µl H<sub>2</sub>O
  - 0.025 mg/ml = 500 µl 0.05 mg/ml + 500 µl H<sub>2</sub>O
  - Background = H<sub>2</sub>O seulement
- Introduire dans les puits 10 µl en 3 répliques de chaque concentration du Background jusqu'à 0.50 mg/ml
- 290 µl de solution: Coomassie Plus Protein Assay Reagent dilué de moitié dans l'eau distillée (1 vol. de Protein Reagent pour 1 volume d'eau).
- Maintenir la plaque 5 minutes à 25°C ou température ambiante
- Lire en point final à 590 nm

En suivant ce protocole, la quantité de protéines dans les puits sera de:

0.00025 0.0005 0.0010 0.0025 0.0050 mg de protéines

La courbe étalon doit s'ajuster à une droite :  $DO = ax+b$  où x est la quantité de protéines dans les puits.

Ne pas oublier de sauvegarder les données de la courbe étalon et la droite elle même.

En utilisant cette formule avec les DO des échantillons, il est possible de déterminer la quantité de protéines (en mg) dans 10 µl de broyat de moustiques (soit 1/20 de la quantité totale de protéines de l'individu). Cette transformation est généralement faite automatiquement par les logiciels fournis avec le spectrophotomètre.

### Courbe étalon de l'Alpha-Naphthyl Acétate (ou Béta-Naphthyl Acétate) et interprétation des données

Le dosage des estérases nécessite également un étalonnage de base à partir d'une solution de l'Alpha-Naphthyl Acétate (ou Béta-Naphthyl Acétate). Cet étalonnage permet de déterminer des





PROCEDURE	Réf. POS RES-VECT
POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides	Version : 2
	Date : 04/11/2013

quantités précises d'estérases et de tracer une courbe d'étalon enregistrée par le logiciel et à laquelle, l'activité des estérases dans chaque moustique testé est ajustée et estimée.

- Préparer une solution mère (SM) d'alpha-Naphtol (MW=144.2g) 100mM dans l'éthanol:

14.42 mg/ml

- Préparer des dilutions intermédiaires

S10 : 10 mM = 150 µl SM + 1350 µl H<sub>2</sub>O

S1 : 1 mM = 200 µl S10 + 1800 µl H<sub>2</sub>O

- Préparer une série de dilutions

4 mM = 400 µl S10 + 600 µl H<sub>2</sub>O

2 mM = 200 µl S10 + 800 µl H<sub>2</sub>O

1.6 mM = 160 µl S10 + 840 µl H<sub>2</sub>O

1.2 mM = 120 µl S10 + 880 µl H<sub>2</sub>O

0.8 mM = 800 µl S1 + 200 µl H<sub>2</sub>O

0.4 mM = 400 µl S1 + 600 µl H<sub>2</sub>O

0.3 mM = 300 µl S1 + 700 µl H<sub>2</sub>O

0.2 mM = 200 µl S1 + 800 µl H<sub>2</sub>O

Background = H<sub>2</sub>O seulement

- Introduire dans les puits 10 µl en 3 répliques de chaque concentration du Background jusqu'à 4 mM
- 90 µl Tampon 1% Triton Phosphate Saline (PBS) pH 6.5 dans chaque puits
- 100 µl de solution: 500 µl d'alpha-Naphthyl acétate 0.06M (ou bêta-Naphthyl acétate) + 2.5 ml Tampon 1% Triton PBS pH 6.5 + 7ml dH<sub>2</sub>O.
- Ne pas incuber: le produit final de la réaction est déjà présent (=alpha-Naphtol)
- 100 µl de solution: 0.008 gr de Fast Garnett Salt (FGBC) dissout dans 10 ml d'eau distillée
- Incuber la plaque 10 minutes à 25°C ou température ambiante avec un couvercle
- Lire en point final à 550 nm

En suivant ce protocole, la quantité de substrat dans les puits sera de:

0.002 0.003 0.004 0.008 0.012 0.012 0.016 0.020 0.040 µmol d'alpha-Naphthol

La courbe étalon doit s'ajuster à une droite :  $DO = ax+b$  où x est la quantité d'alpha-Naphthol dans le puits.

Ne pas oublier de sauvegarder les données de la courbe étalon et la droite elle-même.

En utilisant cette formule avec les DO des échantillons il est possible de déterminer la quantité d'alpha-Naphthol (en µmol) produite par 10 µl de broyat de moustique pendant 30 minutes (temps d'incubation). Cette transformation est généralement faite automatiquement par les logiciels fournis avec le spectrophotomètre.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

L'activité estérasiqique de chaque moustique en  $\mu\text{mol}$  d'alpha-Naphthol produit/min/mg protéine est: (alpha-Naphthol en  $\mu\text{mol}$  produit par 10  $\mu\text{l}$  de broyat/ quantité de protéine (en mg) dans 10  $\mu\text{l}$  de broyat)/30.

### **Courbe étalon des oxydases (Cytochrome P450) et interprétation des données**

Le dosage des mono-oxygénases nécessite un étalonnage de base à partir d'une solution de Cytochrome C Horse Heart type VI. Cet étalonnage permet de déterminer des quantités précises de Cytochrome P450 et de tracer une courbe d'étalon enregistrée par le logiciel et à laquelle, l'activité des oxydases dans chaque moustique testé est ajustée et estimée.

– Cytochrome C Horse Heart type VI (Sigma C7752, MW=12 384)

– Préparer solutions mères dans l'eau distillée

S1 : 0.1 mM = 6.2 mg Cytochrome C + 5 ml H<sub>2</sub>O

S2 : 0.01 mM = 100  $\mu\text{l}$  S1 + 900  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

S3 : 0.001 mM = 100  $\mu\text{l}$  S2 + 900  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

– Préparer les puits en 3 répliques pour les concentrations suivantes:

Background = 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

0.0025 nmol CytC = 2.5  $\mu\text{l}$  S3 + 17.5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

0.005 nmol CytC = 5  $\mu\text{l}$  S3 + 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

0.010 nmol CytC = 10  $\mu\text{l}$  S3 + 10  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

0.015 nmol CytC = 15  $\mu\text{l}$  S3 + 5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

0.020 nmol CytC = 20  $\mu\text{l}$  S3

– 80  $\mu\text{l}$  de Tampon 0.0625M Potassium Phosphate (KHPO<sub>4</sub>) pH 7.2 dans chaque puits

– 200  $\mu\text{l}$  de solution: 0.010 gr 3,3',5,5' Tétraméthyl Benzidine (TMBZ) dissout dans 5 ml de Méthanol (écraser le TMBZ avec la spatule) puis ajouter 15 ml de Tampon 0.25M Sodium Acétate (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) pH 5.0 dans chaque puits

– 25  $\mu\text{l}$  de 3% peroxyde d'hydrogène dans chaque puits

– Incuber 30 minutes à température ambiante avec un couvercle

– Lire en point final à 630 nm

Le Cytochrome C ayant 8 noyaux hèmes au lieu de 1 pour les P450, la concentration dans les puits est 8 fois la concentration en unités équivalentes de P450 (P450 equivalent units). En suivant ce protocole, la quantité de P450 equivalent units dans les puits sera de:

0.000312 0.000625 0.00125 0.001875 0.0025 nmol P450 equivalent units

La courbe étalon s'ajuste à une droite :  $DO = ax+b$  où x est la quantité de P450 equivalent units dans le puits.

Ne pas oublier de sauvegarder les données de la courbe étalon et la courbe elle-même.

En utilisant cette formule avec les DO des échantillons il est possible de déterminer la quantité de "P450 equivalent units" (en nmol) produite par **20**  $\mu\text{l}$  de broyat de moustique. Cette



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

transformation est généralement faite automatiquement par les logiciels fournis avec le spectrophotomètre.

L'activité oxydasique de chaque moustique en nmol P450 equivalent units/mg protéine est:  
(nmol P450 equivalent units pour 20 µl de broyat/(2×(mg protéine dans 10 µl de broyat)))

Interprétation des Données pour les GST

L'interprétation des données pour les GST font appel au coefficient d'extinction molaire et à la loi de Beer:

$DO/\text{minute} = \epsilon cl = \text{coefficient d'extinction molaire} \times \text{concentration} \times \text{longueur de la solution}$

$\epsilon = 9.5$  pour le CDNB

$l = \text{profondeur du puits} = 0.6 \text{ cm pour } 210 \mu\text{l}$

ainsi

$c = \text{concentration molaire} = (DO/\text{minute})/5.76 \text{ ou } = (\text{milliDO}/\text{minute})/(5.76 \times 1000)$

Moles de GSH conjuguées par puits de 210 µl  $x = c \times 210 \times 10^{-6}$  en mole

$x = c \times 0.21$  en millimole

x doit être rapporté à la quantité de protéines par puits c'est à dire pour 10 µl de broyat

Finalement l'activité GST pour chaque moustique en mmol de GSH conjugué/min/mg protéine est:

$((\text{milliDO}/\text{minute} \times 0.21)/(5.76 \times 1000))/\text{mg protéine dans } 10 \mu\text{l de broyat}$



<b>PROCEDURE</b>	Réf. POS RES-VECT
<b>POS RES-VECT : Evaluation de la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides</b>	Version : 2
	Date : 04/11/2013

## 10 ANNEXE 4 : Produits Chimiques utilisés pour les essais biochimiques

Désignation	Companie	Page	référence	Quantité
CDNB	Sigma	268	C-6396	100 g
DTNB	Sigma	423	D-8130	5 g
Cytochrome C Horse Heart type VI	Sigma	343	C-7752	25 mg
Fast Garnet (GBC salt)	Sigma	468	F-8761	5 g
Glutathione Reduced form	Sigma	492	G-6529	5 g
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma	542	H-7020	500 ml
Hydrogen peroxide solution 30%	Sigma	592	H-1009	500 ml
alpha Naphthyl Acetate	Sigma	778	N-8505	25 g
beta Naphthyl acetate	Sigma	778	N-6875	25 g
alpha Naphtol	Sigma	776	N-1000	10 g
beta Naphtol	Sigma	776	N-1250	50 g
Potassium phosphate (Dibasic, trihydrate)	Sigma	858	P-5504	500 g
Potassium phosphate (Monobasic)	Sigma	858	P-5379	500 g
Sodium Acetate 3M pH=5.2	Sigma	1670	S-7899	500 ml
Sodium chloride (NaCl)	Sigma	1003	S-9625	1 kg
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma	1005	S-5881	500 g
Sodium phosphate (Dibasic)	Sigma	1008	S-0876	500 g
Sodium phosphate (Monobasic)	Sigma	1007	S-0751	500
TMBZ	Sigma	1051	T-8768	1 g
Trizma base	Sigma	1099	T-1503	1 Kg
Protein Kit Assay	Pierce		23236	1000 ml
Bovine Serum Albumine Standard	Pierce		23209	10 x 1 ml

