

Résistance phénotypique et enzymatique au sein des populations de *Culex quinquefasciatus* dans la commune de Natitingou, Bénin

[Phenotypic and enzymatic resistance in *Culex quinquefasciatus* from Natitingou, Benin]

Anges YADOULETON^{1,2}, Akadiri YESSOUFOU³, Ramziyath AGBANRIN², Azim BISSIROU³, Falilath SANOUSSI³, Olaitan MOUSTAPHA⁴, Carole SANNI⁴, Mensah Albane⁴, Achaz AGOLINO⁴, Fabrice URSINS², Jacques ZOLA², and Martin AKOGBETO^{2,3}

¹Ecole Normale Supérieure de Natitingou, Université de Natitingou, Benin

²Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Benin

³Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Benin

⁴Ecole Supérieure le FAUCON, Benin

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: For better management of the use of insecticide in public health against *Culex quinquefasciatus*, an arboviral and filarial vector, a study was conducted at Natitingou, a town located in northern Benin, from October 2015 to March 2016, to evaluate the susceptibility of this mosquito to insecticides and the mechanisms of resistance developed.

The protocol was based on mosquito collection during both dry and rainy seasons across the four areas selected in northern Benin. Bioassays were performed on adult mosquitoes collected from the field to assess the susceptibility of filarial vectors to insecticide-impregnated papers (permethrin 0.75%, deltamethrin 0.05%, DDT 4%, and bendiocarb 0.1%) following WHOPEs guidelines.

Moreover, mosquitoes from the susceptible tests were used to search for the presence of the knock down resistance (*Kdr*) and the Acetylcholinesterase (*Ace-1R*) mutations.

Finally, F1 generation of the wild population of *Cx. quinquefasciatus* were used for biochemical analysis to target Mixed Function Oxidase (MFO), non-specific esterase (NSE) and glutathione-S-transferases (GST) enzymes.

This research showed:

1)- A wide spread of resistance to permethrin, deltamethrin and DDT was found in samples of *Cx. quinquefasciatus* despite the collection areas with 4%; 7% ; 19% and 60% as average of mortality respectively with DDT, permethrin, deltamethrin and bendiocarb;

2)- The *kdr* mutation was detected in all areas at various frequencies (0.8 to 0.88) whereas the *Ace-1* mutation was found at a very low frequency ($\leq 5\%$);

3)- Enzymes activities (oxidase, esterase and glutathione-S-transferases) were detected in all mosquito populations despite the areas of collection.

This work has highlighted the high resistance of *Cx. quinquefasciatus* to the 3 classes of insecticides used in public health. Moreover, the high frequency of *kdr* and the presence of enzyme activity in *Cx. quinquefasciatus* will augment the existing data on the insecticide resistance of filariasis vectors and will be useful for making decision to control this mosquito.

KEYWORDS: Resistance, *Culex. quinquefasciatus*, Insecticides, Benin.

RESUME: Dans le but d'une gestion efficace de la résistance des vecteurs de la filariose vis-à-vis des insecticides, une étude a été conduite dans la commune de Natitingou située au Nord-Ouest du Bénin. Le but de cette recherche est d'évaluer le niveau de résistance de *Culex quinquefasciatus*, principal vecteur de la filariose vis-à-vis des insecticides utilisées en santé publique d'une part, mais aussi de rechercher la résistance phénotypique et enzymatique au sein de ces populations de moustiques.

Dans un premier temps, des collectes larvaires ont été organisées dans quatre zones (deux urbaines et deux rurales) où les femelles âgées de 2-5 jours ont été mises au contact des papiers de DDT (4%), de la perméthrine (0,75), de la deltaméthrine (0,05%) et du bendiocarb (0,1%). Dans un deuxième temps, les mécanismes de résistance phénotypiques (knock down resistance (*Kdr*) et celle de l'Acétylcholinestase (*Ace-1R*)) ont été recherchés au sein des populations issues des tests de sensibilité. Enfin, nous avons recherché l'existence de la résistance enzymatique à partir de la F1 des populations de *Cx. quinquefasciatus*.

Les résultats de ces travaux montrent :

1)- une résistance des populations de *Cx. quinquefasciatus* vis-à-vis du DDT, de la perméthrine, de la deltaméthrine et du bendiocarb avec un taux moyen de mortalité de 4% ; 7% et 19% et 60% respectivement ;

2)- les mutations *Kdr* et *Ace-1R* ont été retrouvées au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus*, mais celle de *Kdr* semble être le principal mécanisme phénotypique avec des fréquences élevées (0.80 en moyenne) quelle que soit la zone de collecte ;

3)- la résistance enzymatique a été aussi retrouvée avec une forte expression des monooxygénase P450 et de la Glutathion-s-transférase au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus*, quelle que soit la zone de collecte.

Ce travail a permis de savoir que *Cx. quinquefasciatus* a développé une résistance vis-à-vis des organochlorés, des pyréthrinoides et des carbamates dans la commune de Natitingou. Aussi, les résultats de la résistance phénotypique et enzymatique permettront d'enrichir la base de données existantes sur la résistance des vecteurs de la filariose au Bénin et ceci pour une meilleure gestion de la résistance.

MOTS-CLEFS: Résistance, *Anopheles gambiae*, Insecticides, Bénin.

1 INTRODUCTION

L'urbanisation galopante dans les pays africains entraîne des répercussions importantes sur l'hygiène et la santé des populations [1]. Elle se caractérise par le manque d'infrastructures et d'équipements de gestion des déchets ménagers, l'incivisme et le poids des traditions des populations face aux pratiques d'hygiène et d'assainissement. Cette situation a pour corolaire l'apparition progressive de zones périphériques non urbanisées avec la création de bidonvilles dépourvues de tout réseau d'assainissement et d'approvisionnement en eau potable [2-3].

La ville de Natitingou située au Nord-Ouest du Bénin, connaît actuellement une croissance accélérée due non seulement à l'accroissement naturel de la population mais aussi aux nombreux sites touristiques que regorge cette dernière. Il est fréquent de rencontrer dans cette ville des collections d'eaux usées stagnantes, générées et entretenues par les pratiques humaines d'utilisation de l'eau, des caniveaux mal curés, des puisards à ciel ouvert ou simplement fermés par une tôle. Ces recueils d'eaux usées stationnaires constituent des gîtes particulièrement favorables au développement des stades immatures de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, moustique très anthropophile dont les femelles piquent préférentiellement la nuit à l'intérieur des habitations est responsable de la filariose de Bancroft urbaine [4].

Plusieurs moyens de lutte ont été mises en œuvre pour limiter les nuisances urbaines de ce moustique et par conséquent les filarioses. Au nombre de ces méthodes, la lutte chimique à travers l'utilisation de Moustiquaires imprégnées à Longue Durée d'action (MILD), les aspersion intra-domiciliaires qui apparaissent aujourd'hui comme le moyen le plus efficace [5]. Malheureusement, des problèmes importants subsistent mettant en danger les objectifs et la pérennité des réalisations. La résistance des vecteurs de filariose aux insecticides et qui constitue un handicap à l'éradication de *Cx. quinquefasciatus*.

En Afrique et particulièrement au Bénin, les pyréthrinoides, les carbamates sont utilisés de façon intense dans les zones de culture du coton, du riz et du sorgho contre les insectes ravageurs, les punaises et les acridiens [6-7]. Ces mêmes insecticides sont également utilisés en zones urbaines et rurales contre la nuisance des insectes. Les travaux de Yadouléon et al. [7-9], Akogbeto et al. [10], montrent que la plupart des pesticides utilisés pour contrôler les ravageurs de culture en agriculture sont aussi utilisés en santé publique pour l'imprégnation des MILDs, mais aussi en aspersion intra domiciliaire contre les moustiques adultes, ce qui pourrait augmenter le niveau de résistance des vecteurs de filariose aux insecticides. Cette situation a probablement contribué à l'apparition de la résistance des vecteurs de filariose aux insecticides

et pourrait être un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés et par conséquent compromettre l'espoir que les autorités sanitaires placent dans cette stratégie de protection des populations contre les filarioses.

En effet, au cours de la dernière décennie, l'émergence de la résistance de *Cx. quinquefasciatus* aux différents insecticides utilisés en santé publique a été signalée dans plusieurs pays Africains [11-12 ; 9].

Il serait probable que la résistance a pu être sélectionnée par des facteurs issus du secteur agricole ou en santé publique avec l'existence de plusieurs mécanismes de résistance permettant à *Cx. quinquefasciatus* de survivre.

C'est donc pour élucider cette hypothèse que s'inscrit le présent sujet dont le but est de rechercher les mécanismes de résistance de modification de cibles et enzymatiques chez les populations de *Cx. quinquefasciatus* dans la commune de Natitingou au nord-Ouest du Bénin».

Les données que nous avons enregistrées permettront de réactualiser les informations actuellement disponibles sur le niveau de résistance de *Cx. quinquefasciatus* aux diverses classes d'insecticides et les mécanismes de résistances afférentes.

2 MÉTHODOLOGIE

2.1 ZONES DE COLLECTE DES DONNÉES

La collecte des données a eu lieu dans le département de l'Atacora plus précisément dans la commune de Natitingou (1°23 E, 10°18 N). Quatre points de collecte ont été choisis non loin des zones agricoles. Le choix de la ville de Natitingou se justifie par le fait que depuis 2008, le Programme National de lutte contre le Paludisme utilise une gamme variée de pesticides chimiques en aspersion intra domiciliaire dans cette commune et ceci, dans le but de lutter contre les moustiques adultes. En plus de cela, les paysans, dans le souci de mieux contrôler les ravageurs des cultures, ces derniers utilisent de façon anarchique plusieurs types de pesticides et ceci sans aucun respect des doses recommandées [13].

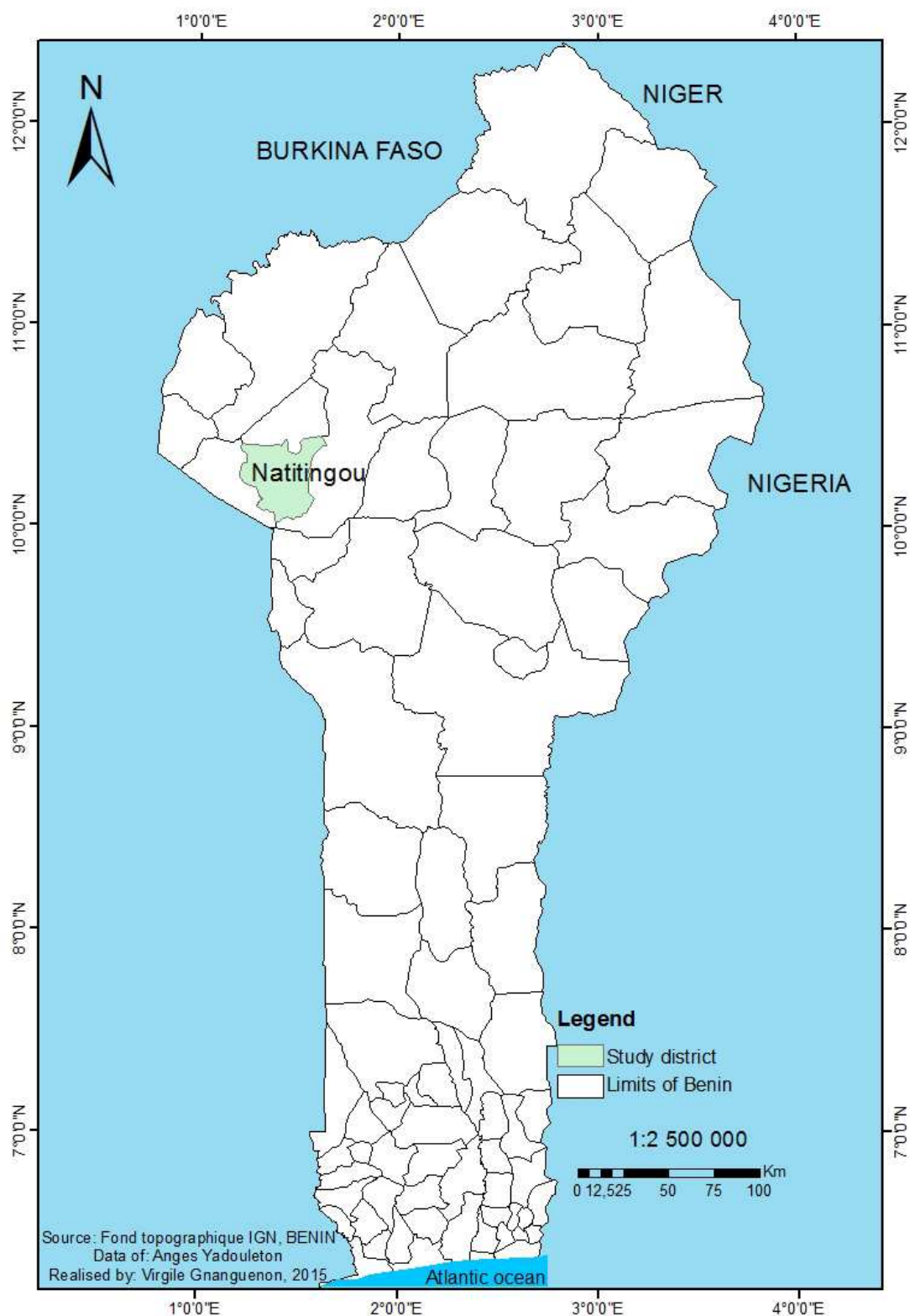


Figure 5 : Carte de la zone d'étude

2.2 COLLECTE LARVAIRE

Plusieurs prospections larvaires ont été faites au niveau des points de collecte. Une fois le gîte repéré, les larves de *Cx. quinquefasciatus* sont identifiées. Ensuite, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau aux moyens de louches, filtrées puis acheminées vers l'insectarium de l'École Normale Supérieure (ENS) de Natitingou pour élevage. A l'apparition des nymphes, elles sont prélevées et mises dans une cage cubique de 30cm de côté pour émergence des adultes. Les adultes sont ensuite identifiés suivant la clé de [14].

Les adultes issus de l'émergence des larves sont mis en cage et nourris à une solution à 20% de saccharose. Les femelles adultes de 2 à 5 jours sont isolées pour être soumises au test de sensibilité/résistance.

2.3 TESTS DE SENSIBILITÉ

2.3.1 TESTS DE SENSIBILITÉ

Les larves de *Cx. quinquefasciatus* récoltées ont été élevées à l'insectarium de l'ENS et les femelles âgées de 2 à 5 jours sont choisies pour les tests de sensibilité. Les tests sont réalisés avec des papiers imprégnés de deltaméthrine à la dose diagnostique de 0,05%. Le choix des doses diagnostiques des papiers imprégnés repose sur les recommandations de l'OMS en matière de ces tests (WHO, 1998). La sensibilité des moustiques à ce produit (delthaméthane) est comparée à celle d'un autre pyréthrianoïde : la perméthrine à 0,75% et d'un organochloré, le DDT à 4% (dose diagnostique). Nous avons testé le DDT pour vérifier s'il existe une résistance croisée entre les pyréthrianoïdes et les organochlorés. Les moustiques ont été aussi soumis aux papiers imprégnés de bendiocarb à 0,1% et les tests ont été réalisés selon le protocole OMS en tube cylindrique [15]. Le temps d'exposition des moustiques aux papiers imprégnés est de 60 minutes et le temps d'observation avant la lecture des résultats est de 24 heures. Dès l'exposition des moustiques à l'insecticide, le nombre de moustiques "knocked-down" (*kd*), c'est-à-dire qui tombent inanimés au fond des tubes OMS est noté après 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes. Après les tests, les moustiques morts et vivants sont conservés séparément sur du silicagel dans des tubes eppendorf et stockés à -20°C (congélateur) pour la recherche des mécanismes de résistance.

Dans le cadre de notre étude, nous avons considéré comme population sensible toute population dont la mortalité est supérieure ou égale à 96%. Lorsque la mortalité est inférieure à 90% la population est considérée comme résistante. Entre les deux valeurs, nous considérons qu'il s'agit d'une suspicion de résistance (baisse de sensibilité).

La souche sensible SLAB (souche de référence en élevage au laboratoire) a été utilisée comme lot contrôle.

2.4 MECANISMES DE RESISTANCE DES ANOPHELES ISSUS DES TESTS DE SENSIBILITE

2.4.1 EXTRACTION DE L'ADN DES MOUSTIQUES

L'ADN a été extrait au CTAB à 2%. Les moustiques (abdomen, ailes et pattes) ont été broyés dans 200 µl de CTAB à 2%. Après 5mn de bain-marie à 65°C, le broyat était mélangé avec 200 µl de chloroforme puis centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5 mn. Le surnageant a été délicatement récupéré dans un autre tube avec 200 µl d'isopropanol puis centrifugé à 12000 tours par minute pendant 15 minutes. Le culot a été conservé avec 200 µl d'éthanol à 70%. L'ensemble a été centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5mn. Le contenu du tube a été délicatement renversé afin de conserver le culot qui était ensuite séché pendant au moins 3 heures sur la paillasse. Enfin 20 µl d'eau bi-distillée était ajoutée au culot, laissé en suspension sur la paillasse pendant toute la nuit ou une demi-journée.

2.4.2 DETECTION DE LA MUTATION KNOCK DOWN (KDR)

Dans chacune des localités choisies, 100 adultes issus des tests de perméthrine et de DDT ont été utilisées pour la recherche de la mutation knock down resistance en se basant sur le principe de la PCR et le protocole de Martinez et *al.* [16] avec modification. Quatre amorces ont été utilisées pour la réalisation de cette PCR. Les deux premières [Cq1 (Forward), 5'-GTGGAAGTTCACCGACTTC-3' et Cq2 (Reverse),

5'-GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG-3'] ont été utilisées pour amplifier le fragment du gène du canal sodique contenant le site de mutation KDR. Par contre, les deux dernières ([CQ3 (Forward), 5'-CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA-3' et Cq4 (Forward), 5'-CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT-3'] ont été utilisés dans le génotypage de la mutation de l'allèle résistante, KDR (CQ3) et la mutation de l'allèle sensible, KDS (CQ4).

2.4.3 DETECTION DE LA MUTATION KNOCK DOWN (KDR)

L'AND extrait des moustiques issus des tests de sensibilité aux papiers imprégnés de bendiocarb a été utilisé pour la détection de la mutation de l'acétylcholinestérase au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus* issues des quatre points choisis. Les amorces Moustdir1 5'-CCG GGN GCS ACY ATG TGG AA-3' et Moustrev1 5'-ACG ATM ACG TTC TCY TCC GA-3' ont été utilisées pour 30 cycles d'amplification (94°C for 30 sec, 52°C for 30 sec, and 72°C for 1 min) suivant le protocole de Weill et al. [17]. La digestion des fragments PCRs a été faite par l'enzyme de restriction *AluI*.

2.4.4 RÉSISTANCE ENZYMATIQUE

Soixante moustiques F1 (femelles issues de la population parentale après élevage) non exposés aux insecticides, ont été analysés pour la recherche d'activité enzymatique. L'activité enzymatique a été évaluée pour chaque moustique selon le protocole de Hemingway [18]. Pour le présent travail, nous avons recherché les activités en Glutathion-s-transférase(GST), en estérase, en monooxygénase P450 et en protéine totale.

Ces choix s'expliquent par le fait que l'usage massif des Organochlorees (OC), des Pyrethrinoïdes (PY) et des carbamates entraînent une sur-expression de ces enzymes au sein du moustique [11].

Les enzymes se dégradant rapidement à température ambiante, les moustiques ont été broyés sur la glace dans 200 µl d'eau distillée puis l'extrait a été centrifugé à 14,000 rpm pendant 2 min.

Suivant l'activité à mesurer, on procède de la façon suivante :

- **Glutathion-S-Transférases**

10 µl de broyat de moustiques en deux répliques ont été mis dans chaque puits de plaque Nunc auquel on a ajouté 200 µl d'une solution de glutathion sous forme réduit (GSH) et de CDNB (1-chloro-2,4-Dinitrobenzene). Après incubation à 25°C, on fait une lecture en cinétique à 340 nm pendant 5 minutes.

- **Oxydases**

Après avoir mis 20 µl de broyat en deux répliques dans chaque puits, on ajoute 80 µl de tampon Potassium Phosphate (KHPO4) 0.0625M pH 7.2 puis 200 µl d'une solution de Tétraméthyl Benzidine (TMBZ) 0.25M pH 5.0 puis, 25 µl d'une solution de 3% de peroxyde d'hydrogène dans chaque puits. On incube la plaque pendant 1h puis on fait une lecture en point final à 630 nm à chaque 10 min.

- **Estérases non spécifiques**

90 µl de broyat en deux répliques ont été mis dans chaque puits de plaque auquel on a ajouté 90 µl de Tampon 1% Triton Phosphate Saline (PBS) pH 6.5. Le mélange ainsi fait, la plaque est laissée pendant 10 minutes à 25°C ou à température ambiante. Puis on ajoute 100 µl d'une solution composée de alpha-Naphthyl acétate 0.3M (ou bêta-Naphthyl acétate) et de Triton PBS pH 6.5 à laquelle on ajoute de l'eau. On incube à nouveau la plaque pendant 30 min puis on ajoute une solution de Fast Garnett Salt (FGBC). Le mélange ainsi réalisé, on laisse incuber la plaque à nouveau pendant 10 minutes à 25°C ou à température ambiante avec un couvercle et on fait une lecture en point final à 550 nm.

- **Protéines Totales**

Dans chaque puits de la plaque, 10 µl de broyat en deux répliques ont été mis auquel on ajoute 200 µl de solution composée de Coomassie et Protein Assay Reagent. Après incubation de la plaque pendant 5 minutes à 25°C ou à température ambiante, on fait la lecture en point final à 590 nm.

3 RÉSULTATS

3.1 SENSIBILITE DE *CX. QUINQUEFASCIATUS* AUX INSECTICIDES

3.1.1 NIVEAU DE RESISTANCE DES POPULATIONS DE *CX. QUINQUEFASCIATUS* AUX INSECTICIDES

Plus de 3000 moustiques âgés de 2-5 jours ont été mis au contact des papiers imprégnés d'insecticide de perméthrine à 0,75%, de deltaméthrine à 0,05%, de DDT à 4% et du bendiocarb (0,1%). Il ressort de ces tests que :

- *Cx. quinquefasciatus* a développé une résistance vis-à-vis du DDT avec un taux moyen de 4% de mortalité pour la zone urbaine et 3% pour la zone rurale (Figure 2).
- Concernant les pyréthriinoïdes (perméthrine, deltaméthrine), *Cx. quinquefasciatus* a développé une résistance vis-à-vis de ces insecticides quelle que soit la zone de provenance des moustiques. En effet, le taux de mortalité moyen est de 8% en zone urbaine contre 6% en zone rurale lorsque les populations de *Cx. quinquefasciatus* sont mises en contact avec les papiers de perméthrine. Avec la deltaméthrine, ces taux sont de 20% et 18% respectivement en zone urbaine et rurale (Figure 3 & 4).
- Cette résistance a été aussi observée avec le bendiocarb avec un taux de mortalité de 75% dans les zones urbaines contre 72% dans les zones rurales (Figure 5).

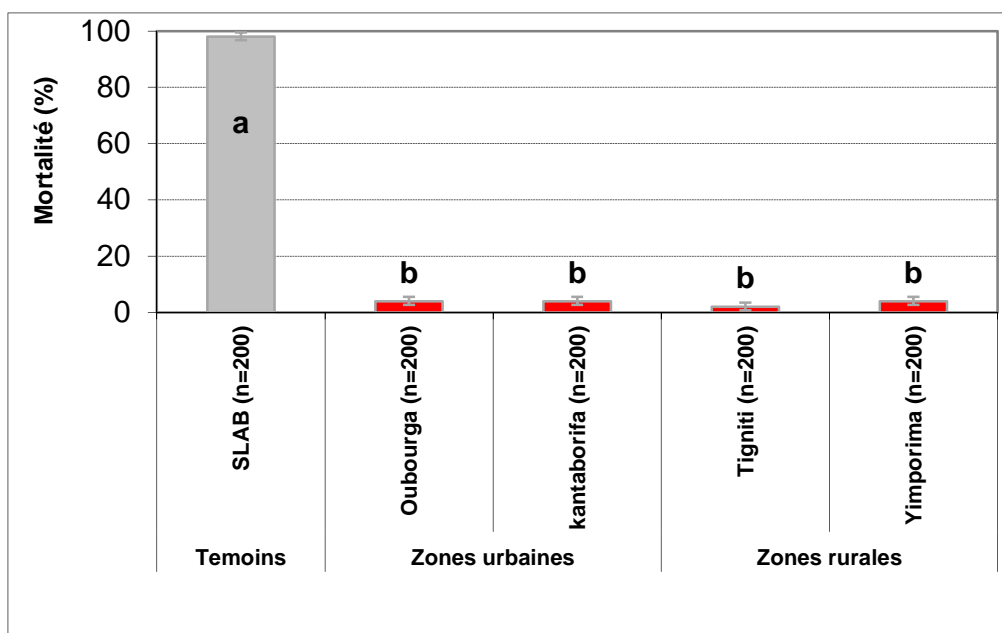


Figure 2: Mortalité observée après exposition des populations de *Cx. quinquefasciatus* au DDT (4 %)

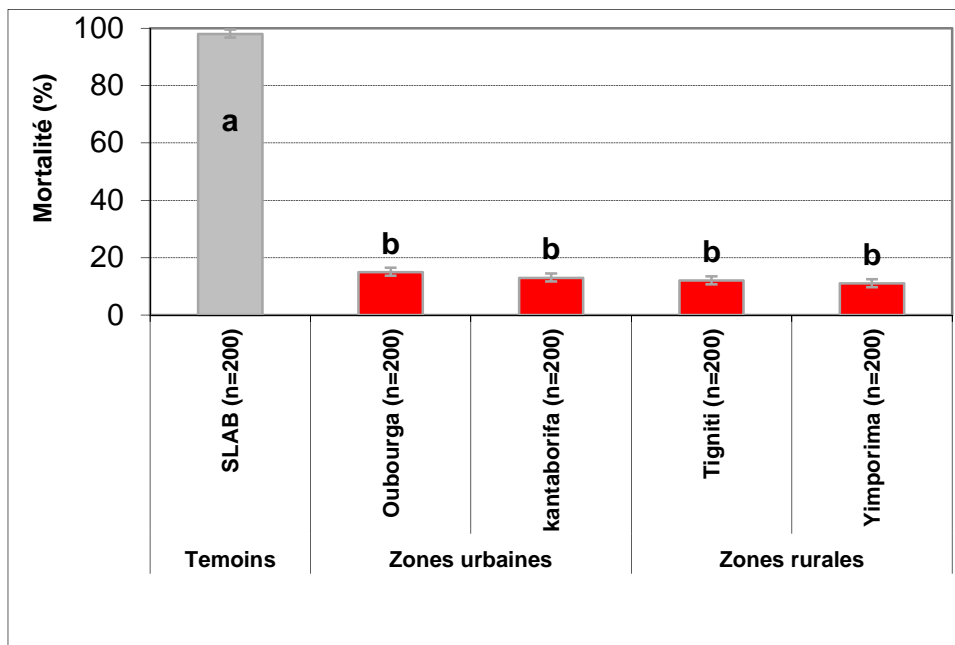


Figure 3: Mortalité observée après exposition des populations de *Cx. quinquefasciatus* à la perméthrine

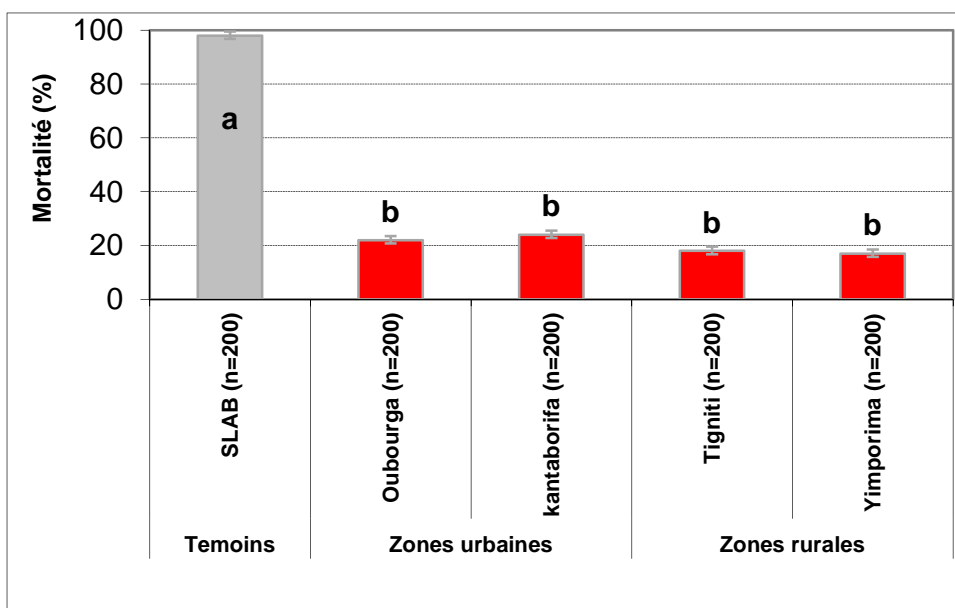


Figure 4: Mortalité observée après exposition des populations de *Cx. quinquefasciatus* à la deltaméthrine.

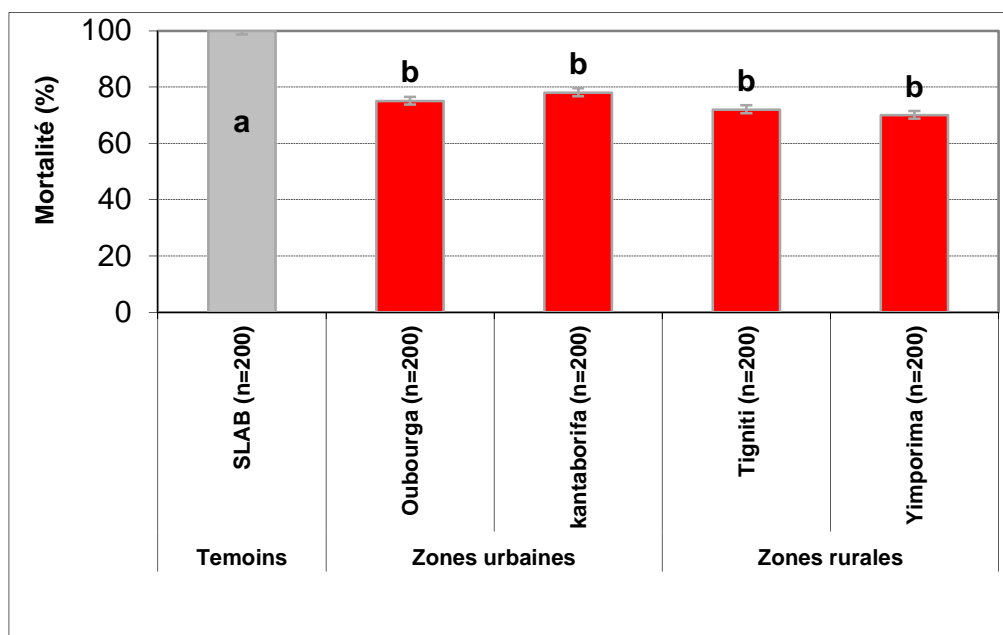


Figure 5: Mortalité observée après exposition des populations de *Cx. quinquefasciatus* au bendiocarb

3.2 MECANISME DE RESISTANCE : PCR ESPECES, FORMES, *KDR* ET *ACE-1*

Dans chaque localité, 102 moustiques ont été analysés pour la recherche des mécanismes de modification de cibles (*Kdr* et *Ace-1*).

- Dans les zones rurales et urbaines à Natitingou, le gène *Kdr* semble être le principal mécanisme de résistance observé au sein de ces populations de *Cx. quinquefasciatus* avec une forte fréquence (Tableau I) au sein des populations issues des deux zones de collecte zones rurales (0,8 en moyenne).
- La mutation *Ace-1* a été également mise en évidence avec une fréquence de 0,25 et 0,27 respectivement en zones rurales et urbaines au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus*.

Tableau I : Répartition des fréquences *Kdr* et *Ace-1* de *Cx. quinquefasciatus* issues des zones d'études

Sites d'étude	Localités	Mutation <i>Kdr</i>				Mutation <i>Ace-1R</i>			
		SS	RS	RR	F(R)	SS	RS	RR	F(R)
Zones urbaines	Oubourga	3	21	78	0,88 ^a	24	06	06	0,25 ^a
	Kantaborifa	4	24	74	0,84 ^a	24	06	06	0,25 ^a
Zones rurales	Tigniti	4	30	68	0,81 ^a	30	08	9	0,27 ^a
	Yimporima	4	32	66	0,80 ^a	30	08	0	0,27 ^a

NB. Les valeurs de la même colonne avec des lettres en exposant ne sont significativement pas différent avec le test de Fisher's ($P > 0.05$)

3.3 RÉSISTANCE ENZYMATIQUE

• Activités estérases

Les résultats de nos travaux de recherche ont montré la présence d'activité estérasique (A et B de la Figure 6) au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus* issues de nos diverses zones d'études. Bien qu'elle existe, cette activité a été très faible dans l'ensemble des moustiques. Cependant, lorsqu'on compare l'activité des moustiques de la souche témoin (SLAB) à celle des moustiques issus des zones rurales et urbaines de Natitingou, on constate qu'il n'existe pas de différence significative en ce qui concerne les activités estérasesiques de type beta (β) et celles du lot témoin ($P > 0,05$) (A de la Figure 6). Cependant, ces mêmes populations ont exprimés une activité estérasique de type alpha (α) significativement plus élevée par rapport à la souche témoin ($P < 0,05$) (B de la Figure 6).

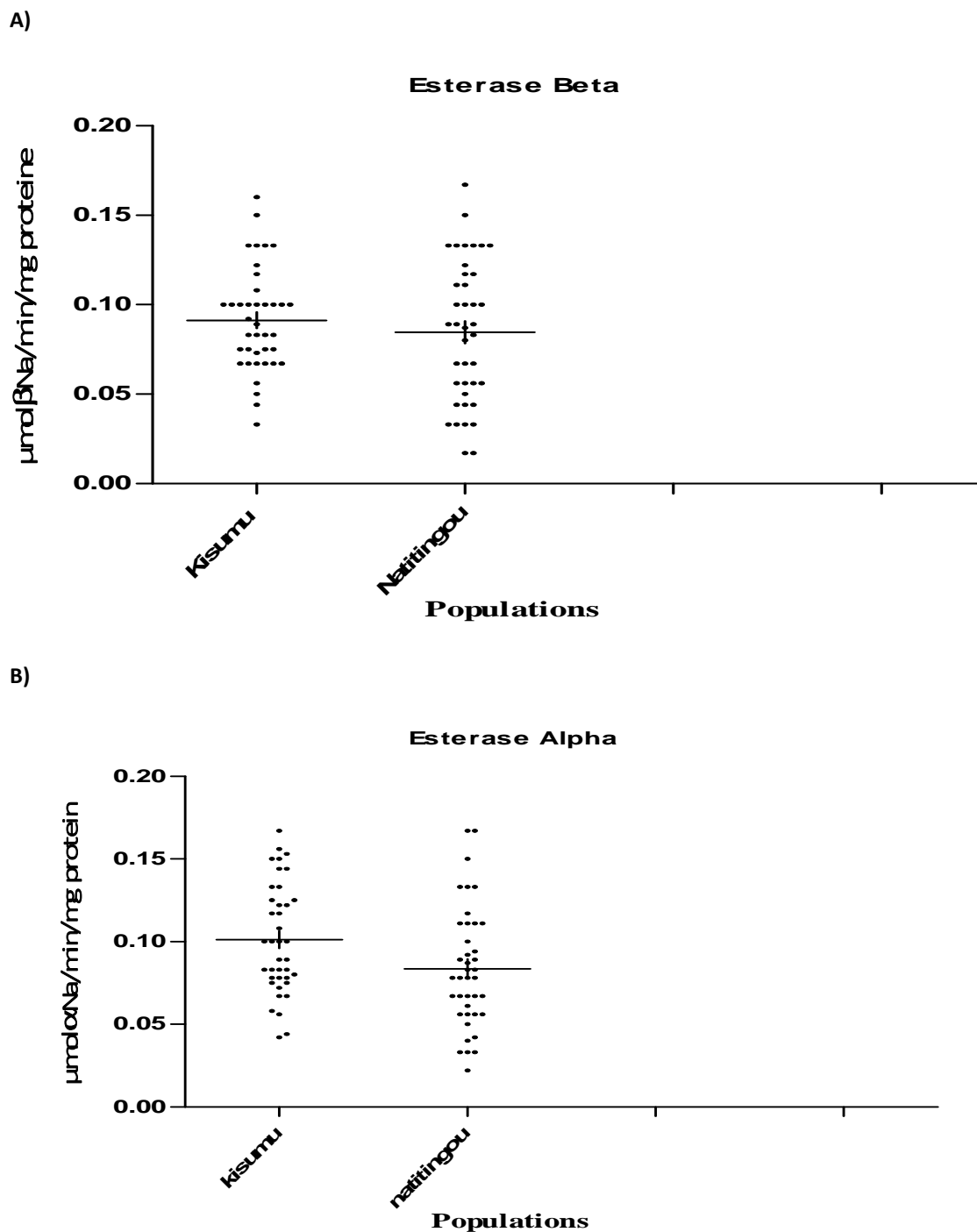


Figure 6 : Activités estérasiqes au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus* issues des sites d'étude.

- **Activités en monooxygénase P450 au sein des moustiques**

La figure 7 montre que la quasi-totalité des populations de *Cx. quinquefasciatus* issues des diverses zones d'étude ont en leur sein de fortes activités oxydase comparées à la souche témoin SLAB ($P < 0,05$). En effet, l'activité en oxydase au sein des populations de moustiques est fonction de la pression insecticide.

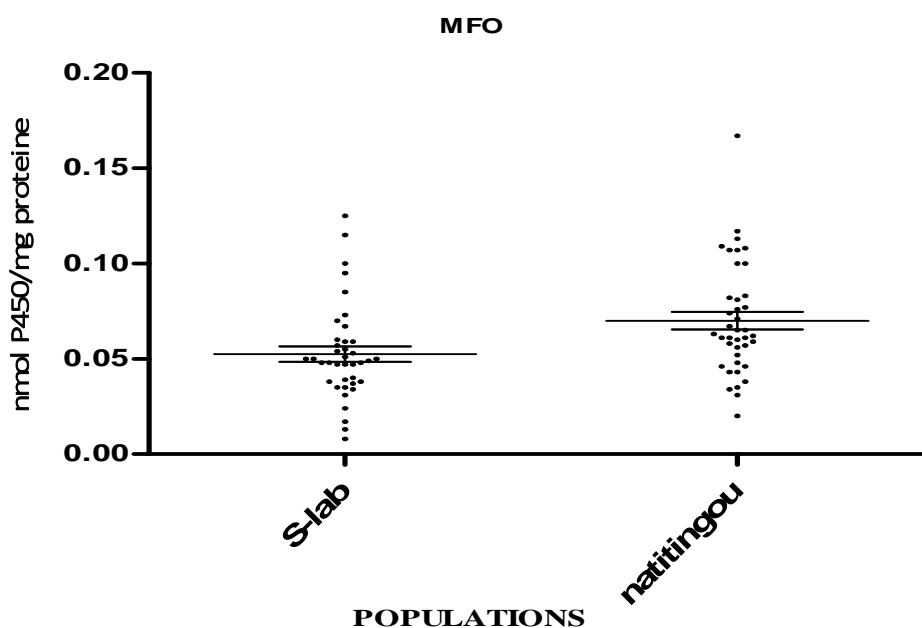


Figure 7 : Activités en oxydase au sein des populations de *Culex quinquefasciatus* issues des sites d'étude

- Activités en Glutathion-s-transférase

Le GST a été présent au sein de toutes les populations de *Cx. quinquefasciatus* issues des diverses zones d'étude. Cependant, il existe une forte activité en GST au sein des populations sauvages issues des divers sites d'études par rapport à la souche sensible SLAB ($P < 0,05$) (Figure 8).

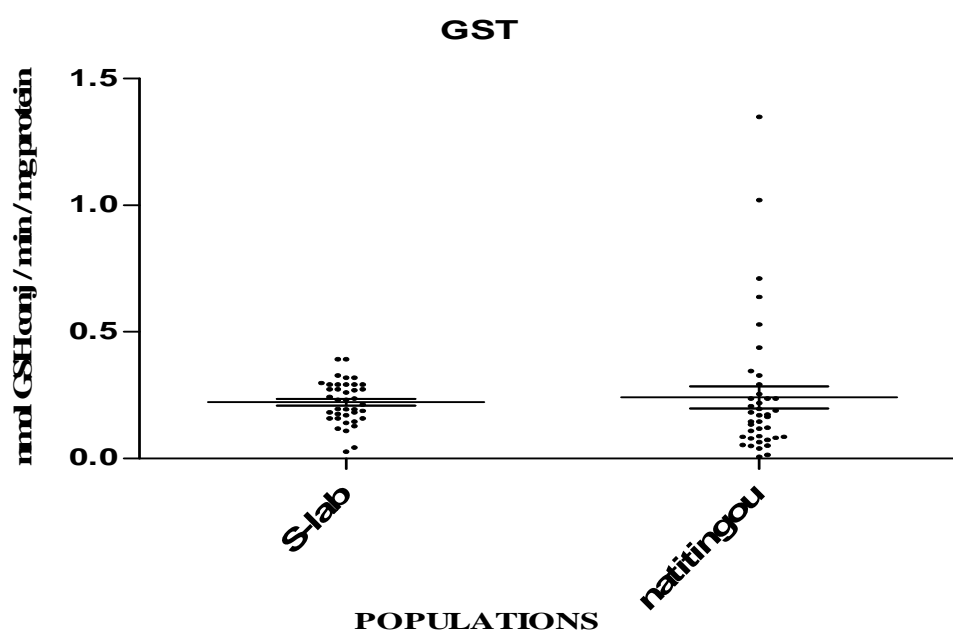


Figure 8 : Activités en GST au sein des populations de *An. gambiae* issues des sites d'étude

4 DISCUSSION ET CONCLUSION

Culex quinquefasciatus, principal vecteur de *Bancroft* urbaine en Afrique, a développé une forte résistance vis-à-vis des insecticides dans les zones à forte et à faible utilisation d'insecticides agricoles (rurales et urbaines) dans la commune de Natitingou. Contrairement à ce à quoi nous nous attendions, cette résistance a été observée non seulement dans les zones urbaines mais aussi et dans les zones rurales caractérisées par la culture de coton et du maraîchage dans les milieux ruraux où l'on distingue une agriculture traditionnelle de céréales qui ne nécessite ni l'usage d'insecticides agricoles, ni d'engrais.

Cette résistance croisée aux Pyréthrinoïdes et au DDT observée au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus* provenant de notre site d'étude est due à la forte utilisation d'insecticides agricoles contre les ravageurs de cultures. En effet, les pratiques paysannes en matière d'utilisation d'insecticides dans les zones maraîchères et surtout cotonnières pour lutter contre *Helicoverpa armigera* (principal ravageur du coton) et *plutella xylostella* (principal ravageur du chou) constituent un facteur de sélection d'insectes résistants non seulement au niveau des ravageurs des cultures mais aussi chez les vecteurs du paludisme [19]. Après les traitements insecticides, des particules de pesticides entrent en contact avec les gîtes larvaires. Ces particules exercent soit une action létale sur les larves de certaines populations d'insectes soit une pression sélective et qui conduit progressivement à la sélection de la résistance aux insecticides chez certaines populations de moustiques notamment chez *Cx quinquefasciatus*. Yadouleton et al. [9] ont montré que de nombreux produits chimiques sont utilisés contre les ravageurs dans les zones agricoles précédemment citées. Ces auteurs pensent que cette utilisation massive de pesticides dans le monde agricole au Bénin serait due à la libéralisation du secteur d'intrant au Bénin. Dans les années 1960, le rôle sélectif des traitements agricoles à base de composés organochlorés (OC) sur la résistance de *Cx quinquefasciatus*, a été observé au Mali dans des zones qui n'avaient jamais fait l'objet de traitements en santé publique mais où ces insecticides étaient largement utilisés en agriculture. En Côte d'Ivoire et au Burkina Faso il a été montré à la fin des années 1990 que le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides de la famille des pyréthrinoïdes augmentait au cours de la saison cotonnière [20].

Par ailleurs, nos travaux de recherche ont montré également la résistance de *Cx. quinquefasciatus* vis-à-vis des carbamates en particulier avec le bendiocarb. Cette résistance observée s'explique par l'utilisation du bendiocarb par le programme National de Lutte contre le Paludisme en aspersion intra domiciliaire depuis 2010. Bien que l'utilisation de cet insecticide comme alternatif aux pyréthrinoïdes a permis de réduire la transmission du paludisme dans cette localité (Natitingou) et ailleurs [21 ; 10], sa fréquence répétée a permis de sélectionner la mutation acétylcholinestérase au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus*. Aussi, les travaux de Yadouleton et al. [8] ont montré que bon nombre de paysans en zones cotonnières comme Natitingou utilisent le Tihan, un insecticide de la famille des carbamates sans aucun respect des doses et fréquences d'application pour lutter contre les ravageurs des cultures.

Les résultats de nos travaux de recherche confirment une fois encore la sélection de la résistance au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus* vis-à-vis des pyréthrinoïdes, des organochlores et des carbamates.

Par ailleurs, les fortes fréquences de la mutation du gène *Kdr* et l'apparition de la mutation *Ace-1R* observées au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus* suggèrent que des mesures soient prises pour une utilisation rationnelle des pesticides chimiques tant dans le monde agricole qu'en santé publique. Cette démarche permettra de limiter la sélection de la résistance à travers une rotation des insecticides, gage de l'utilisation durable des moustiquaires imprégnées d'insecticides contre les nuisances culicidiennes.

Aussi, la présence de fortes activités en glutathion -S- transférase au sein de toutes les populations sauvages de *Cx. quinquefasciatus* issues des divers sites, confirme la forte résistance de ce moustique vis-à-vis du DDT constatée et rappelle les travaux de Corbel et al. (2007). De plus, la forte activité en monooxygénase P450 dans toutes les populations de *An. gambiae* s.s n'est qu'une conséquence des fréquences élevées du gène *Kdr* observée chez *Cx. quinquefasciatus* dans les échantillons collectés (Tableau I). Cette forte activité en oxydase rappelle aussi les travaux de Corbel et al. [11] expliquant la forte utilisation des pyrethrinoïdes et des carbamates dans cette commune de Natitingou.

Ces deux gènes métaboliques se retrouvant à de fortes fréquences au sein des populations de *Cx. quinquefasciatus*, il serait important de quantifier à la longue ces gènes par la technique de qPcr pour une bonne gestion de la résistance de *Cx. quinquefasciatus* vis-à-vis des insecticides.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Ecole Normale Supérieure de Natitingou pour son soutien financier lors de la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- [1] Knuden (A.B.) et Slooff (R.), 1992. Problèmes dus aux maladies à transmission vectorielle et urbanisation accélérée : Nouvelles approches de la lutte antivectorielle. Bull. OMS 70 (2) : 165-171p.
- [2] Dossou-yovo (J), Doannio (J), Rivière (F), Chauvancy (G), 1995. Urbanization and establishment of *Culex quinquefasciatus* in a west African rural area. Acta Trop. Jun;59(3):251-3.
- [3] Nwoke (B.E.), Nduka (F.O.), Okereke (O.M.), Ehighibe (O.C.), 1993. Sustainable urban development and human health: septic tank as a major breeding habitat of mosquito vectors of human diseases in south-eastern Nigeria. Appl Parasitol. Feb;34(1):1-10.
- [4] Wirth (M.C.), Marquine (M.), Georghiou (G.P.), Pasteur (N.), 1990. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. Department of Entomology, University of California, Riverside 92521. J Med Entomol 1990 Mar;27(2):202-6
- [5] Jones C, Machin C, Majambere K, Ali S, Khatib A, Mcha O, Ranson H, Kelly-Hope LA. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* from Zanzibar: implications for vector control programmes. Parasit Vectors. 2012; 5:78
- [6] Akogbeto M, Djouaka R, Noukpo H. Use of agricultural insecticides in Benin. Bull Soc Pathol Exot 2005;98:400-405
- [7] Yadouleton A, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio Bangana S, Corbel V, N'Guessan R., Gbénou D., Imorou Y., Gazard K., Akogbéto M. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. Malar J 2010a 9:83. doi: 10.1186/1475-2875-9-83
- [8] Yadouleton AW, Martin T, Padonou G, Chandre F, Alex A, Djogbenou L, Dabiré R, Aïkpon R, Glitoh I, Akogbeto MC., Cotton pest management strategies on the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* populations in northern Benin. Parasites and Vectors 2011, 4:60
- [9] A. Yadouléton, K. Badirou , R. Agbanrin, H. Jöst, R. Attolou, R. Srinivasan, G. Padonou M. Akogbéto ; 2015. Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. Parasites and Vectors. 8:17-29
- [10] Akogbeto M, Padonou G, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. Malar J, 9:204. (2010)
- [11] Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. Acta Trop 2007, 101:207-21
- [12] Ouedraogo (T.D.), Baldet (T.), Skovmand (O.), Kabre (G.), Guiguemde (T.R.), 2005. Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* to insecticides in Bobo Dioulasso, Burkina Faso. Bull Soc Pathol Exot. 2005 Dec; 98(5) : 406-10. French.
- [13] A. Yadouleton, R. Agbanrin, C. Vodounon, G. padonou, K. Badirou, R. Attolou, F. Ursins, J. Zola, H. Allagbé, and M. Akogbéto; 2014. "Seasonal distribution of *Aedes aegypti* in southern Benin: a risk of dengue virus transmission to urban populations. International Journal of Innovation and Applied Studies 9:648-654
- [14] Gillies MT, de Meillon B: The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). Johannesburg. The South African Institute for Medical Research; 1968
- [15] WHO. Evaluation de la santé. Rapport sur la Santé dans le monde. La vie au 21^e siècle, une perspective pour tous, World Health Organisation (ed), Genève Suisse, 1998, 43-65.
- [16] Martinez Torres D, Chandre F, Williamson M S, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, and Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol 1998 ; 7: 179-84
- [17] Weill M, Duron O, Labbe P, Berthomieu A, Raymond M., Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. Med Sci, 2003; 19 1190-1192.
- [18] Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardenal KG, Ranson H. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1998 Oct 29;353(1376): 1695-9
- [19] Martin T, Assogba-Komlan F, Sidick I, Ahle V, Chandre F: An acaricide-treated net to control phytophagous mites. Crop Protection 2010, 5: 470-475.
- [20] Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, and Guillet P: Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Cote d'Ivoire. J Am Mosq Control Assoc 1999b, 5: 53-59.
- [21] Aïkpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, Oké-Agbo F, Akogbéto M: Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. Parasit Vectors. 2013, 6: 192-10.1186/1756-3305-6-192.