

N° 12 / ENT.77
du 25.07.1977

N° 6.539 / DOC.TECH.OCCGE.

SENSIBILITE ET RESISTANCE
DES INSECTES AUX INSECTICIDES
EN AFRIQUE TROPICALE

par

J.BRENGUES et M.COOSEMANS (1)

Sommaire

1. Introduction
2. Facteurs influant sur la sensibilité d'une population normale
3. Les phénomènes de résistance
4. Mesure de la sensibilité et de la résistance
5. La résistance des insectes en Afrique
6. Solutions à envisager en cas de phénomènes de résistance
7. Conclusion

Annexe I. Mesure de la sensibilité et de la résistance des moustiques adultes aux insecticides organochlorés et organophosphorés

Annexe II. idem pour les larves de moustiques aux insecticides organochlorés et phosphorés.

C.R.S.T.O.M.

Fonds Documentaire (1) Entomologistes médicaux de l'O.R.S.T.O.M.

N° : 81/77/00171 ex 1

Cote : B

Date : 6 AVR. 1977

~~22 SEP. 1977~~

~~O. R. S. T. O. M.~~

~~Collection de Référence~~

~~n° Ent. Med.~~

1. INTRODUCTION.

L'emploi massif des insecticides dans le monde, soit pour détruire les insectes vecteurs de maladies, soit pour protéger les cultures, a souvent entraîné une modification importante des populations d'insectes qui a pu amener la sélection de souches résistantes aux produits appliqués pour les détruire. Par définition, la résistance est l'apparition dans une population d'insectes, de la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet léthal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce.

Dans toute opération de lutte insecticide, il faut donc tenir compte du risque d'apparition des phénomènes de résistance. La résistance doit être détectée le plus tôt possible afin que des mesures adéquates puissent être prises rapidement. Pour ce faire, la sensibilité des arthropodes aux insecticides doit être mesurée avant, pendant et après les opérations de lutte.

2. FACTEURS INFLUANT SUR LA SENSIBILITE D'UNE POPULATION NORMALE.

En dehors de tout phénomène de résistance, il faut d'abord noter que la sensibilité aux insecticides est sous la dépendance de facteurs liés à l'insecte et aux conditions d'exposition.

- facteurs liés à l'insecte.

La sensibilité peut varier d'un sexe à l'autre et, en général, les mâles sont plus sensibles que les femelles.

L'âge est aussi un facteur important de variation. En règle générale, les individus âgés sont moins sensibles que les individus jeunes. Ceci est particulièrement net pour les larves de moustiques.

L'état physiologique influe aussi sur la sensibilité. Ainsi, chez les femelles de moustiques, les individus à jeun sont plus sensibles que les gorgés et les gravides; au cours du cycle gonotrophique, la sensibilité varie et atteint son maximum 24 heures après la prise d'un repas de sang.

La qualité de la nourriture et le parasitisme, en particulier chez les larves de moustiques, peuvent aussi influencer sur le degré de sensibilité.

Des variations saisonnières ont aussi été enregistrées. Ainsi les femelles d'anophèles des zones tempérées sont beaucoup moins sensibles en début d'hibernation qu'en période d'activité.

- facteurs liés aux conditions d'exposition.

La température influe de façon importante sur la sensibilité. En général, une augmentation de la température entraîne un accroissement de toxicité des produits insecticides mais le phénomène inverse a été noté avec le DDT. Par contre, l'humidité ne semble pas influencer sur la toxicité des insecticides, dans les conditions expérimentales. Néanmoins, la diffusion des poudres mouillables sur certains substrats (paille, boue séchée) varie en fonction de l'humidité.

La formulation de l'insecticide, c'est-à-dire la taille des particules, la nature de la matière inerte (poudre, diluant, solvant) influent aussi sur le niveau de sensibilité des insectes.

Ces différentes causes de variations de la sensibilité des arthropodes aux insecticides montrent la nécessité de standardiser la méthodologie des tests, afin de comparer des résultats obtenus en des lieux ou des moments différents. Dans ce but l'O.M.S. a mis au point des tests normalisés pour mesurer la sensibilité des principaux arthropodes aux insecticides.

3. LES PHENOMENES DE RESISTANCE.

3.1. Nature de la résistance.

Tout d'abord, il convient d'éliminer toutes les causes de variations de sensibilité dépendant des facteurs que nous venons de mentionner. Nous faisons aussi abstraction de l'effet irritant ou répulsif de certains produits insecticides qui, entraînent une modification du comportement de l'insecte, lui permette d'éviter le contact avec un produit toxique. Par exemple, l'effet irritant du DDT sur Anopheles gambiae. La vraie résistance physiologique est un caractère génétique et par conséquent héréditaire, tout comme la couleur des yeux et des cheveux chez l'homme.

La résistance peut être mono ou polygénique. Il est évident que la résistance monogénique est plus facile à combattre en ajoutant, par exemple, un synergisant (voir chapitre 6) qui contrecarre le seul processus de résistance. Très souvent, la résistance d'un insecte à un produit assure une protection vis-à-vis de composés voisins; par exemple la résistance à la dieldrine entraîne une résistance aux insecticides organochlorés voisins (HCH, chlordane...). Cependant, il n'est pas rare d'observer des résistances croisées vis-à-vis de molécules chimiquement très différentes; par exemple une résistance au DDT associée à une résistance aux organophosphorés et aux pyréthri-noïdes.

En fait, les phénomènes de résistance ont un support biochimique, parfois mal connu, qui fait qu'un même mécanisme de défense peut entraîner des résistances multiples et, inversement, que la résistance à un même groupe d'insecticides peut être sous la dépendance de divers mécanismes de défense. On sait, par exemple, qu'il peut se former chez l'insecte une acetylcholinesterase mutante qui, sous l'action de l'insecticide, est moins vite inhibée que l'enzyme normal. Dans ce cas, on constate une résistance multiple variable d'un composé à l'autre. Cette forme de résistance est grave car elle engendre de nombreuses résistances croisées. La résistance peut aussi découler d'une intensification de la détoxification des produits qui est sous la dépendance de différents enzymes:

- DDT - dechlorhydrase qui affecte le DDT et ses analogues, les transformant en DDE,
- hydrolases qui agissent sur les organophosphorés et sur les pyréthri-noïdes.
- oxydases qui affectent les organophosphorés, carbamates, pyréthri-noïdes, DDT et analogues.

Certaines oxydases étant capables de détoxifier des composés très différents (par exemple un insecticide chloré tel que le DDT et un organophosphoré tel que le diazinon), il est logique d'observer des résistances croisées pour ces produits.

La résistance peut aussi découler d'autres modifications constitutionnelles telles qu'une moindre pénétrabilité, par un produit toxique, de la cuticule de l'insecte. Ce type de résistance considéré comme secondaire peut devenir important lorsqu'il est associé à d'autres formes de résistance.

3.2. Développement de la résistance.

Il est essentiel de rappeler que la sélection d'une souche résistante découle de la mortalité de la fraction de la population sensible au produit utilisé. Le développement de la résistance dépend de caractères propres à l'insecte et du mode d'utilisation de l'insecticide.

- caractères propres à l'insecte.

Pour que la résistance apparaisse il faut qu'il existe, dans la population d'origine, au moins quelques individus génétiquement résistants; le cas échéant ils seront sélectionnés progressivement. La sélection sera beaucoup plus rapide si le gène de résistance est du type dominant que s'il est de type récessif. La succession rapide de générations, l'isolement et une faible dispersion des populations d'insectes favorisent aussi l'apparition de phénomènes de résistance.

- mode d'utilisation des insecticides.

Dé façon simple, plus on élimine d'individus dans une population normale d'insectes, plus on favorise la sélection d'individus résistants. Aussi l'emploi d'insecticides rémanents, efficaces pendant de longues périodes (plusieurs mois après leur application), la répétition fréquente de traitements sur de grandes surfaces concourent à la sélection rapide d'individus résistants. Cette sélection est beaucoup moins rapide lorsque des applications moins nombreuses dans le temps et dans l'espace ainsi qu'une dispersion suffisante des insectes favorisent la dilution des individus résistants.

4. MESURE DE LA SENSIBILITE ET DE LA RESISTANCE.

L'échec d'opérations de lutte insecticide ne suffit pas pour conclure à une résistance des insectes. En effet, cet échec peut aussi être dû à une défaillance ou à une mauvaise application du produit toxique, à une prolifération inhabituelle des insectes. De plus, lorsqu'il y a résistance, il est nécessaire de mettre en évidence le phénomène avant qu'il ait compromis les opérations de lutte. Pour ce faire, l'OMS a mis au point des méthodes standardisées qui permettent de déterminer la sensibilité ou la résistance des principaux insectes d'intérêt médical, aux insecticides usuels. En annexe I à II, nous donnons les méthodes à suivre pour tester la sensibilité des moustiques adultes et larves, aux insecticides organochlorés et organophosphorés usuels.

Pour déceler d'éventuels phénomènes de résistance, il faut d'abord connaître la sensibilité de la population normale, non soumise à l'effet de l'insecticide; comparer ensuite la sensibilité de populations provenant de zones traitées et non traitées; suivre enfin l'évolution dans le temps de la sensibilité des populations provenant des zones traitées.

Dans les tests de sensibilité, on fait en sorte que l'insecte soit exposé à l'insecticide, par contact forcé, pendant un temps déterminé avec un papier traité ou dans une suspension d'insecticide. Pour mesurer la sensibilité on peut faire varier la concentration de l'insecticide et mesurer la dose ou la concentration létale (DL ou CL). Si la quantité d'insecticide absorbé est proportionnelle au temps de contact, on peut aussi faire varier ce temps et calculer le temps létal (TL). Dans le cas de plusieurs espèces de moustiques la quantité d'insecticide absorbé est proportionnelle au temps de contact, lorsque ce temps varie de 15mn à 8heures.

Pour une population normale d'insectes, la mortalité due à un insecticide varie en fonction du logarithme de la concentration ou du temps de contact suivant une courbe de Gauss (courbe en cloche, voir fig. 1 A). Cette variation est dite log-normale. En fait, au cours des épreuves insecticides on enregistre des mortalités cumulées qui, sur papier semi-logarithmique, se traduisent par une sigmoïde (voir fig. 1 B). Comme la courbe de Gauss et la sigmoïde sont des courbes difficiles à tracer et à interpréter, on préfère utiliser une représentation linéaire. Pour transformer la sigmoïde en droite, on utilise du papier gaussien-logarithmique (voir fig. 2, droites A et B). Ces droites sont appelées lignes de régression.

- remarques pratiques pour mesurer la sensibilité.

- 1) prendre un lot témoin pour évaluer la mortalité normale dans les conditions expérimentales.
- 2) prendre plusieurs concentrations ou plusieurs temps de contact en progression géométrique puisque la mortalité varie en fonction du logarithme de la concentration ou du temps, par exemple (progression de raison 2):
 - concentrations: 0,5%, 1%, 2%, 4%
 - temps: 15mn, 30mn, 1heure, 2 heures.
- 3) corriger les mortalités obtenues avec l'insecticide par la mortalité témoin. Pour cela on utilise la formule d'Abbott:

$$\text{mortalité corrigée \%} = \frac{\text{mortalité observée} - \text{mortalité témoin \%}}{100 - \text{mortalité témoin \%}} \times 100$$

(mortalité témoin doit être inférieure ou égale à 20%).

- 4) porter sur papier gaussien-logarithmique les mortalités corrigées pour chaque concentration ou temps de contact.
- 5) si possible, tracer une droite représentative des différents points obtenus. Il est à noter que les mortalités voisines de 50% sont les plus représentatives de la population. Le tracé de la droite doit particulièrement tenir compte des points correspondant à ces mortalités.
- 6) lire graphiquement la dose concentration ou temps léthal pour 50% des individus (DL_{50} , CL_{50} , TL_{50}).

- diagnostic de la résistance.

Nous avons déjà vu (voir chap.2) que la sensibilité d'une population normale peut varier en fonction de facteurs liés à l'insecte et aux conditions d'exposition. Ainsi pour une même population on peut obtenir deux niveaux de sensibilité sensiblement différents, tels que ceux représentés par les droites A et B de la fig.2.

Graphiquement, le phénomène de résistance se manifeste de façon différente. Lorsque le processus de sélection est en cours, on constate un infléchissement au niveau des concentrations élevées et au-delà d'une certaine mortalité (fig.2 C). Cet infléchissement montre l'existence d'individus résistants dont la proportion est définie par le niveau auquel se situe le plateau. Dans le cas de la figure 2 C, on constate que plus de 15% des individus survivent à une concentration de 4% de DDT. Cette même figure montre que l'apparition de la résistance se manifeste d'abord pour des concentrations élevées sans qu'il y ait de modifications de la CL_{50} . Pour un diagnostic précoce de la résistance il faut donc tester régulièrement les insectes à une dose capable, selon toute probabilité, de tuer tous les individus sensibles. Cette dose est appelée dose diagnostique ou dose discriminative.

Cette dose discriminative a pu être déterminée au laboratoire sur des colonies sensibles des principaux insectes vecteurs. Nous donnons au tableau 1 les doses discriminatives provisoires concernant les anophèles, Aedes aegypti et Culex pipiens fatigans.

5. LA RESISTANCE DES INSECTES EN AFRIQUE.

Les phénomènes de résistance se sont développés au cours des dernières années et, comme nous l'avons déjà mentionné, ont été favorisés par l'utilisation d'insecticides à des fins agricoles, pour protéger les cultures (coton, riz ...). Ces actions phytosanitaires ont eu pour conséquence d'éliminer certains des ennemis naturels des insectes vecteurs, tels que les arthropodes prédateurs. En agriculture, les insecticides sont aussi souvent utilisés avant leur application en santé publique; dans ce dernier domaine les produits doivent d'abord faire preuve de certaines qualités (efficacité, faible toxicité pour la faune non cible...) qui ne sont pas toujours contrôlées avant les usages agricoles. Enfin les nombreux produits utilisés en agriculture, de composition chimique très variée, ont permis la sélection de populations de vecteurs capables de détoxifier de nombreux insecticides.

Nous traiterons successivement de la résistance aux insecticides des principaux vecteurs des maladies africaines.

5.1. Anophèles et paludisme.

Parmi les anophèles autres que les vecteurs majeurs du paludisme, quelques phénomènes de résistance ont été observés, notamment pour:

- A.pharoensis, résistant au DDT et à la dieldrine en Egypte et au Soudan, au DDT en Ethiopie.
- A.rufipes, résistant à la dieldrine/HCH au Mali.

Les anophèles vecteurs majeurs du paludisme sont A.funestus et 4 des 5 espèces du complexe A.gambiae: A.gambiae s.s. (A), A.arabiensis (B), A.melas et A.merus; seul A.quadriannulatus (C), espèce zoophile, ne transmet pas le paludisme humain. Deux autres espèces (A.nili et A.moucheti) sont des vecteurs du paludisme d'importance régionale ou locale.

Chez les vecteurs du paludisme, aucun phénomène de résistance n'a été observé pour A.melas, A.merus et A.moucheti. Pour A.nili, une résistance à la dieldrine/HCH a été notée au Ghana. Pour les vecteurs majeurs (A.gambiae, A.arabiensis et A.funestus) la résistance à la dieldrine/HCH est générale, elle est parfois associée à une résistance au DDT:

	<u>Résistance au DDT + dieldrine/HCH</u>	<u>Résistance à la dieldrine/HCH</u>
<u>A.gambiae</u> A:	Bénin, Cameroun, Empire Centrafricain, Haute-Volta, Nigeria.	Congo, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée équatoriale, Kenya, Liberia, Mali, Mauritanie, Sénégal, Sierra-Leone.
<u>A.gambiae</u> B:	Sénégal, Soudan, Swaziland.	Ethiopie, Haute-Volta, Kenya, Mauritanie, Mozambique, Nigeria, Rhodésie du Sud, Tchad.
<u>A.funestus</u>	-	Cameroun, Ghana, Haute-Volta, Kenya, Nigeria.

En Afrique tropicale, les anophèles restent sensibles aux organophosphorés et aux carbamates, ce qui n'est pas le cas dans certains pays d'Amérique latine, d'Asie et d'Europe orientale.

5.2. Aedes et fièvre jaune.

Le principal vecteur des épidémies de fièvre jaune, Aedes aegypti, est habituellement résistant aux insecticides organochlorés (DDT, dieldrine, HCH) en Amérique tropicale et en Asie du Sud-Est. Cette résistance, en particulier à la dieldrine, se développe aussi en Afrique. La résistance aux insecticides organophosphorés n'a pas été observée en Afrique, elle a été seulement suspectée au Congo. Cette résistance aux organophosphorés (malathion, fenthion, fenitrothion, temephos, chlorpyrifos) est apparue dans différents pays d'Amérique et d'Asie. En Thaïlande, on a même observé une résistance à un pyréthriinoïde (bioresméthrine).

L'autre principal vecteur des épidémies de fièvre jaune, Aedes vittatus, est sensible aux insecticides; une résistance au DDT a été cependant observée aux Indes.

5.3. Culicinés et filariose.

Dans les zones rurales d'Afrique tropicale, les vecteurs majeurs de la filariose de Bancroft sont ceux du paludisme: A. gambiae s.l. et A. funestus. Il se pose donc les mêmes problèmes de résistance (voir 5.1.).

En milieu urbain et dans certaines zones rurales d'Afrique de l'Est, Culex pipiens fatigans est aussi un vecteur naturel important. En Afrique de l'Ouest et du Centre où la pullulation de cette espèce est plus récente, C.p. fatigans n'est pas un vecteur naturel bien qu'il puisse transmettre expérimentalement. Ce moustique est devenu rapidement résistant aux insecticides organochlorés classiques (DDT, dieldrine, HCH) dans toutes les régions où il existe. Cette résistance a favorisé sa pullulation, en tous les points où l'utilisation des insecticides organochlorés a entraîné la disparition des espèces culicidiennes et des autres insectes compétitifs ou prédateurs. La résistance de C.p. fatigans à de nombreux insecticides organophosphorés (malathion, fenthion, fenitrothion, temephos, chlorpyrifos et même parathion) a été observée dans différents pays, notamment au Cameroun, en Guinée, à Madagascar et en Sierra-Leone. Cette résistance est aussi apparue en Amérique du Nord et en Asie et implique de recourir à des huiles minérales dans la lutte larvicide.

5.4. Simulies et onchocercose.

Pendant longtemps, on a utilisé des émulsions de DDT pour détruire les larves des deux vecteurs de l'onchocercose africaine: Simulium damnosum et S. neavei. Dans la lutte contre S. damnosum, la résistance au DDT a commencé à apparaître en Afrique de l'Ouest, notamment au Ghana et au Nigeria. Actuellement cet insecticide a été remplacé par un organophosphoré (Abate: temephos) qui est moins polluant, plus sélectif et auquel les larves de simules restent sensibles.

5.5. Poux, thyphus et borreliose.

Le poux du corps, Pediculus humanus var. corporis est souvent résistant au DDT et à la dieldrine/HCH en Afrique occidentale. Le poux de tête, P. humanus var. capitis, est aussi résistant à ces insecticides en Europe. En Afrique, la résistance de P. humanus var. corporis au malathion (organophosphoré) est apparue en Egypte et au Burundi.

5.6. Insectes nuisants.

La mouche domestique, Musca domestica, est habituellement résistante aux organochlorés. Elle est aussi souvent résistante aux organophosphorés mais, en Afrique, reste sensible à ces produits, sauf au malathion. En Europe, certaines souches sont même résistantes aux pyréthri-noïdes et à un juvénoïde (methoprène). La mouche verte, Chrysomyia putoria est résistante au DDT et à la dieldrine/HCH à Madagascar, en Tanzanie et au Zaïre; elle est aussi résistante aux organophosphorés au Zaïre.

Parmi les punaises des lits, Cimex lectularius est habituellement résistante aux insecticides organochlorés; il en est de même pour C.hemipterus en Gambie, Haute-Volta, Kenya et Madagascar; cette dernière espèce est aussi résistante à la dieldrine/HCH au Bénin et en Tanzanie; elle est résistante au DDT en Somalie.

La blatte cosmopolite, Blatella germanica, est généralement résistante aux organochlorés.

5.7. Insectes sensibles.

A notre connaissance, aucun phénomène de résistance n'a été détecté chez les glossines, phlébotomes et chez Phtirus pubis (pou du pubis). Il faut cependant noter que peu de tests ont été réalisés. De plus, dans le cas particulier des glossines, la lutte insecticide appliquée de façon ponctuelle et discontinue dans les foyers de trypanosomiase ainsi que la longue durée de développement et la faible reproduction de ces insectes ne favorisent pas l'apparition rapide de phénomènes de résistance (voir 3.2.).

6. SOLUTIONS A ENVISAGER EN CAS DE PHENOMENES DE RESISTANCE.

Le développement de phénomènes de résistance ne signe pas nécessairement l'échec d'une lutte insecticide. Cependant, à partir d'un certain niveau, la résistance est incompatible avec l'efficacité de la lutte. Dans ce cas, la première solution consiste à changer d'insecticide. Il faut cependant noter la fréquence des résistances croisées. L'exemple de la résistance à la dieldrine qui entraîne une résistance croisée à tous les composés organochlorés du groupe des cyclodiènes est maintenant bien connue. De même, la résistance à un insecticide organophosphoré ou à un carbamate entraîne souvent la résistance à des produits des mêmes groupes chimiques. Il faut bien dire que les phénomènes de résistance croisée sont actuellement mal connus et qu'il est bien difficile de prévoir si la résistance à un insecticide n'est pas associée à une résistance à des composés voisins ou même à des produits chimiquement très différents. Ces résistances multiples ont une base biochimique pas toujours élucidée (voir 3.1.). Bien que le risque de résistance croisée soit important, il existe cependant des produits de remplacement:

- organophosphorés et carbamates pour remplacer les organochlorés usuels.
- pyréthri-noïdes de synthèse qui ont l'avantage d'être peu toxiques pour les mammifères, photostable à la différence des pyréthrines naturelles, mais pas toujours aussi stable que les organophosphorés et les carbamates. A ce sujet, notons cependant qu'un produit nouveau (OMS-1998= Decis) a montré, aussi bien en application intradomiciliaire que sur la végétation, une excellente rémanence à des doses très faibles.
- organochlorés biodégradables qui, dans certains cas, ont l'avantage d'être moins rémanents que leurs homologues classiques mais avec qui les résistances croisées peuvent être fréquentes et qui doivent être utilisées à des doses élevées.

- inhibiteurs d'enzymes de détoxification qui, par leur action synergisante, peuvent contrecarrer les phénomènes de détoxification. Ces produits sont souvent instables et, pour éviter leur dégradation rapide, peuvent être incorporés aux molécules d'insecticide; ils ont aussi l'inconvénient d'être toxiques et d'un coût élevé.

En dehors de l'emploi des produits de remplacement ou d'association, on peut éviter ou retarder l'apparition des phénomènes de résistance en réduisant la fréquence des traitements insecticides, la rémanence des produits, la surface traitée à un niveau compatible avec le succès de la lutte chimique.

Cette lutte chimique par insecticide peut aussi faire place ou, au moins, être associée à d'autres formes de lutte tels que:

- l'assainissement du milieu qui consiste à supprimer les gîtes larvaires et les lieux de repos des adultes (assèchement, drainage, éclaircissements de la végétation, enlèvement des ordures...).

- l'emploi de prédateurs tels que certains insectes des familles des *Dytiscidae*, *Hydrophylidae*, *Notonectidae* et certains poissons larvivores (*Gambusia affinis*, *Lebistes reticulatus*, *Poecilia* sp....). L'importation de prédateurs doit être faite de façon prudente, compte-tenu du risque de prolifération de ces espèces.

- l'emploi de parasites tels que les vers nématodes de la famille des *Mermithidae*, les bactéries du groupe *Bacillus thuringiensis*, les microsporidies et les champignons du genre *Coelomomyces*.

- la lutte génétique qui a pour but d'introduire dans une population naturelle un facteur génétique susceptible de compromettre la descendance de cette population. Cette lutte repose sur le lâcher d'individus stériles ou d'individus incompatibles d'un point de vue cytoplasmique ou de toute autre façon avec la population naturelle.

- la stérilisation par des moyens physiques (par divers rayons ou par le froid) ou par des substances chimiques (aziridines, substances antimétabolites, antihormones, phéromones...). Les individus sont, soit stérilisés au laboratoire puis lâchés, soit autostérilisés dans la nature au moyen d'appâts.

- l'emploi d'inhibiteurs du développement qui peuvent être des inhibiteurs de mue (juvénoïdes) tels que le méthoprène, efficaces au cours de la 2^e moitié du stade larvaire ou des inhibiteurs de formation de la chitine qui agissent à tous les stades d'évolution larvaire et au moment de la transformation de la nymphe en adulte (dimiline, par exemple); contre toute attente quelques cas de résistance croisée avec certains insecticides organophosphorés et carbamates ont été observés.

Il faut bien reconnaître qu'en dehors des mesures d'assainissement du milieu, peu de méthodes peuvent actuellement remplacer ou simplement compléter la lutte chimique par insecticides. La plupart de ces méthodes sont encore au stade expérimental et, dans l'immédiat, seuls les inhibiteurs du développement des insectes permettent d'avoir quelque espoir.

7. CONCLUSION.

La résistance de nombreux insectes vecteurs ou nuisants à différents groupes d'insecticides s'est énormément développée au cours des dernières années. Cette situation est fort préoccupante car il n'existe plus, dans certains cas, une large gamme de produits de remplacement. Pour pallier cet état de faits, il serait nécessaire et urgent de rechercher de nouveaux produits insecticides et de mettre au point d'autres méthodes susceptibles de remplacer les méthodes chimiques. Nous avons vu que les méthodes de lutte génétique, biologique et physique n'ont pas encore donné, sur le plan pratique, de résultats satisfaisants. La sélection de nouvelles molécules n'est pas non plus une solution d'avenir car, pour des raisons

économiques, les recherches en ce domaine ont tendance à se réduire et les nouveaux produits efficaces sont habituellement utilisés à large échelle dans la protection des cultures avant leur emploi en santé publique; il en résulte souvent une apparition rapide de nouveaux phénomènes de résistance(1)

Sans vouloir sous-estimer l'intérêt des recherches sur les différentes formes de lutte, il paraît tout aussi important de développer les mesures d'assainissement et d'approfondir nos connaissances sur la bio-écologie des vecteurs, afin d'appliquer avec un maximum d'efficacité toutes les formes de lutte et de prévention.

Bibliographie sommaire

- BROWN (A.W.A.) et PAL (R.), 1973.- Résistance des arthropodes aux insecticides. Org.mond.Santé, Monogr.38.
- BUSVINE (J.R.), 1973.- Progress in research on resistance in arthropods. Pesticide Science, 4, 491-499.
- BUSVINE (J.R.) et PAL (R.), 1969.- Conséquences de la résistance aux insecticides pour la lutte contre les vecteurs et les maladies qu'ils transmettent. Bull.Org.mond.Santé, 40, 731-744.
- OMS, 1973.- Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17^o rapport OMS d'Experts des insecticides. Org.mond.Santé, sér.Rap.techn., n°443.
- OMS, 1976.- Résistance des vecteurs et des réservoirs de maladies aux pesticides. 22^o rapport du Comité OMS d'Experts des insecticides. Org.mond.Santé, sér.Rap.techn., N°585.
- OMS, 1976.- Résistance des vecteurs de maladies aux pesticides. WHO/VBC/76.609.
- QUELENNEC (G.), 1972.- La lutte contre les arthropodes vecteurs de maladies transmissibles à l'homme. Rapport ORSTOM, Paris, 51p.

(1) - une exception importante est à signaler: l'Abate, organophosphoré utilisé notamment dans la lutte contre les simulies, n'est utilisé qu'en santé publique.

Tableau 1 - Doses discriminatives provisoires concernant les anophèles, Aedes aegypti et Culex pipiens fatigans (in: OMS-1976. Rapp.techn. N° 585).

Insecticides	jeunes femelles à jeun <u>Anopheles</u> (papiers imprégnés en % d'insecticide)	larves (parties par million)		
		<u>Anopheles</u>	<u>C.p.fatigans</u>	<u>Ae.aegypti.</u>
DDT	4% - 1 heure	2,5	-	0,05
HCH	-	0,5	-	-
dieldrine	0,4% - 1 heure	0,1	-	0,02
malathion	5,0% - 1 heure	3,125	1,25	0,25
fenitrothion	1,0% - 2 heures	0,125	0,05	0,05
fenthion	2,5% - 1 heure	0,05	0,05	0,05
parathion	-	0,125	-	-
Abate (téméphos)	-	0,625	0,02	0,02
Dursban (chlorpyrifos)	-	0,025	0,01	0,01
Baygon (propoxur)	0,1% - 1 heure	-	-	-

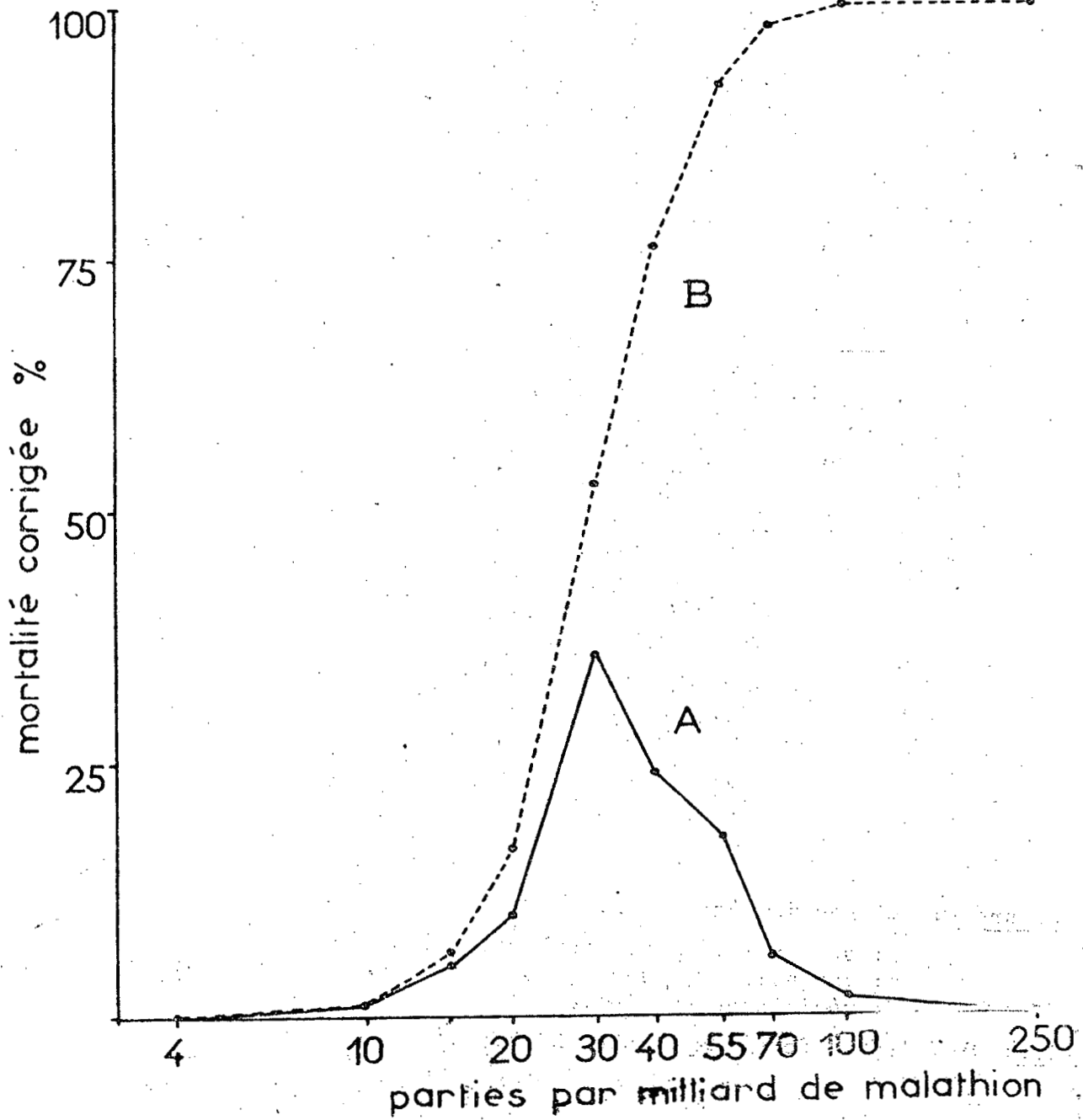


Figure 1. Représentation sur papier semi-logarithmique de la mortalité des larves de C.p.fatigans exposées au malathion.

A: mortalité différentielle (courbe de Gauss).
 B: mortalité cumulée (sigmoïde).

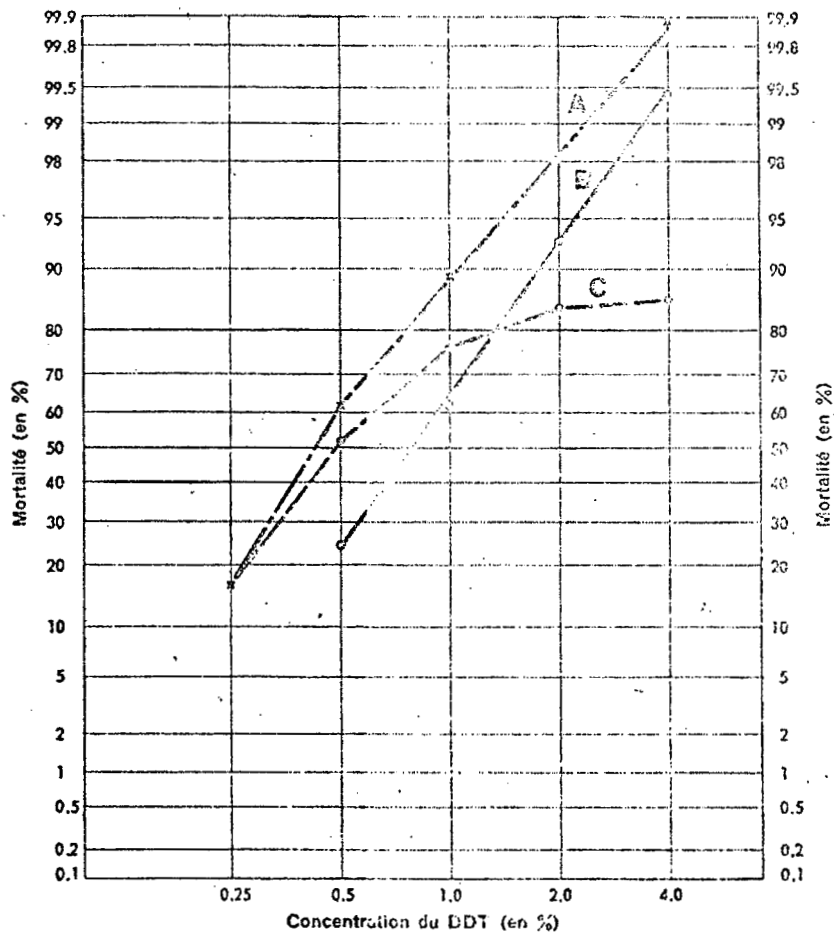


Figure 2. Lignes de régression.

A: sensibilité de la population étudiée.

B: variations saisonnières ou tolérance constitutionnelle.

C: résistance partielle.

(in: OMS, 1976.- Série Rap. Techn. N° 585).

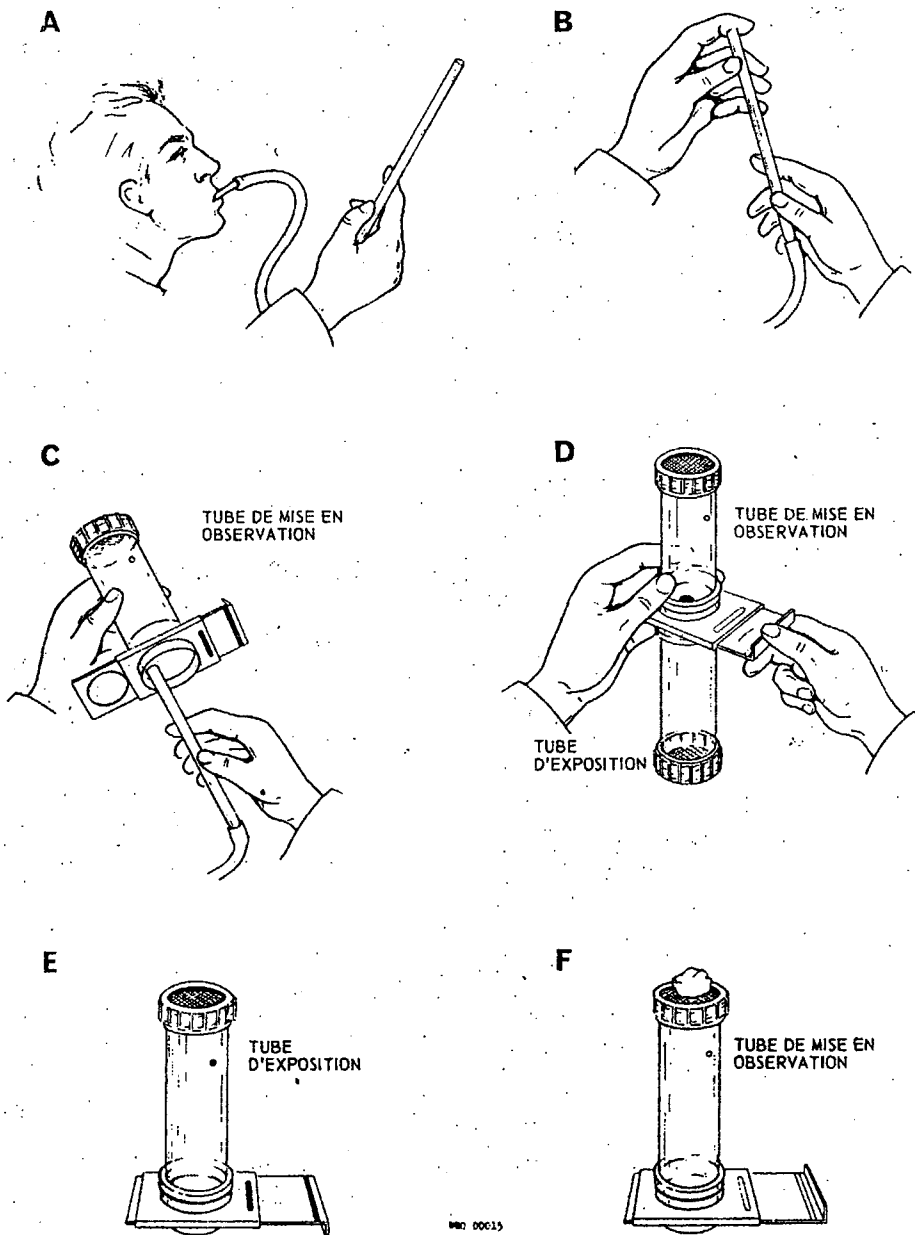


Figure 3. Epreuve pour la détermination de la sensibilité ou de la résistance des moustiques adultes aux composés organochlorés et organophosphorés.

ANNEXE 1. Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des moustiques adultes aux insecticides.

1. Etude de base: établissement d'une courbe de référence.

Des lots de moustiques sont exposés à différentes concentrations d'insecticides (organochlorés) ou aux concentrations étalons pendant des périodes de temps différentes (organophosphorés). On dénombre, après 24 heures, les insectes morts.

Il est recommandé de faire tout d'abord une épreuve préliminaire. On obtiendra ainsi l'ordre de grandeur du degré de sensibilité à prendre en considération dans la suite des opérations.

Avec les tests aux organochlorés, on choisira alors une gamme de 4 concentrations, dont certains tueront seulement une fraction des insectes (une concentration au moins devra donner une mortalité de 100% et une autre une mortalité inférieure à 50%).

Avec les tests aux organophosphorés on choisira une gamme de 4 durées d'exposition, en progression géométrique (par ex. 1/2, 1, 2, 4 h) telles que la plus longue détermine une mortalité de 100% et la plus courte inférieure à 50%.

Quatre épreuves parallèles doivent être exécutées avec chacune des 4 concentrations (organochlorés) ou avec chacune des durées d'exposition (organophosphorés) sur des spécimens provenant de la même population de moustiques.

Afin de mettre en évidence l'éventail complet des variations naturelles, cette série d'épreuves doit, dans la mesure des possibilités pratiques, être répétée en plusieurs lieux et en différentes saisons.

Même si, en raison d'applications antérieures d'insecticides à diverses fins, il n'est pas possible d'établir une véritable droite de référence (c.à.d. une courbe représentative d'une population n'ayant jamais été exposée à un traitement), le degré de sensibilité de l'espèce vectrice doit être immédiatement déterminé.

Le temps d'exposition des témoins devra être égal à l'exposition la plus longue au papier imprégné.

2. Contrôles périodiques par les épreuves faites avec les doses diagnostiques.

Les tests sont réalisés périodiquement avec 5 fois 15 moustiques par tube: si l'on dispose d'un nombre limité de moustiques, on pourra se contenter de deux épreuves parallèles.

L'observation occasionnelle de survivants lors de ces contrôles peut s'expliquer par une variation normale. Si, toutefois, l'observation de survivants se produit régulièrement (par exemple 3 fois de suite) il convient de pousser les recherches.

Les doses diagnostiques.

Il a été démontré que les expositions suivantes tuent toutes les espèces d'anophèles sensibles:

- 4% DDT - 2 heures
- 0,4% dieldrine - 1 heure
- 5% malathion - 1 heure (excepté An. quadrimaculatus)
- 1% fenitrothion - 2 heures
- 2,5% fenthion - 1 heures
- 0,1% propoxur - 1 heure (excepté A. sacharovi).

Pour Culex pipiens fatigans nous avons les expositions suivantes:

- 5% malathion - 1/2 heure
- 1% fénitrothion - 1 heure
- 2,5% fenthion - 1/2 heure
- 0,1% propoxur - 2 heures.

Ces données ont été obtenues avec de jeunes femelles à jeun à 27°C. Il est probable que ces données soient valables pour les femelles gorgées.

3. Choix des spécimens.

Il faut utiliser exclusivement des femelles. Il est recommandé de choisir des spécimens récemment gorgés, présentant les signes d'un repas de sang. Si les moustiques sont peu nombreux, il est permis d'utiliser un lot mixte de femelles gorgées et non gorgées, à condition de consigner la composition du lot. Les moustiques peuvent avoir été capturés dans des locaux préalablement traités ou non de la zone considérée, mais leur origine doit être indiquée sur la formule du rapport. Quand il n'est pas possible de capturer des moustiques adultes en nombre suffisant, on peut essayer de se procurer l'effectif désiré en récoltant des insectes incomplètement développés et en les élevant pour obtenir des adultes. Dans certains cas, on peut utiliser exclusivement des femelles non gorgées de sang, prélevés par exemple parmi les insectes récemment éclos provenant d'une collecte de larves.

4. Conditions de l'épreuve.

Les épreuves doivent être exécutées dans des locaux indemnes, si possible, de toute contamination par des insecticides et dans lesquels ne règnent pas des conditions extrêmes de température, d'humidité, d'éclairage et de ventilation. Autant que possible, les épreuves ultérieures de contrôle doivent être réalisées dans des conditions semblables de température et d'humidité. Le transport des insectes à un laboratoire central modifie souvent la mortalité, sous l'effet de facteurs autres que l'insecticide lui-même: on s'en aperçoit aisément à la forte mortalité qui se produit alors chez les témoins.

5. Composition du nécessaire d'épreuve.

Le nécessaire comprend:

- a) 20 tubes en matière plastique, de 125 mm de longueur et de 44mm de diamètre; 8 d'entre eux (marqués d'une pastille rouge) serviront à exposer les moustiques à l'insecticide; 2 (marqués d'une pastille verte) seront utilisés pour observer les témoins qui ne sont pas exposés à l'insecticide; les 10 autres (marqués également d'une pastille verte) serviront comme tubes de mise en observation (sélection préalable des insectes et observation des résultats après l'exposition). Chaque tube est fermé à l'une de ses extrémités par un tamis de numéro mesh 16. Pour identifier les concentrations utilisées, les tubes marqués de rouge doivent être numérotés de 1 à 8; les deux tubes destinés aux témoins et marqués de vert porteront les numéros 9 et 10, et les tubes de mise en observation seront numérotés de 1a à 10a;
- b) 10 manchons filetés aux deux extrémités, traversés perpendiculairement à leur axe d'une plaque coulissante percée d'un orifice de 20mm de diamètre;

ORGANOCHLORES

Pour tests diagnostiques.

- .2 paquets de papiers imprégnés de 4% DDT (isomère -p'p') dans l'huile minérale (Risella 17, Shell)
- .2 paquets de papiers imprégnés de 0,4 et 4% dieldrine (HEOD purifié) dans l'huile minérale
- .1 paquet de papiers simplement imprégnés d'huile minérale.

Pour étude de base.

c) 5 paquets de papiers imprégnés de DDT (isomère-p,p') dans l'huile minérale (Risella 17, Shell) aux concentrations respectives de 0,25%, 0,5%, 1%, 2% et 4%; 1 paquet de papiers simplement imprégnés d'huile minérale; 7 paquets de papiers imprégnés de dieldrine (HEOD purifié) dans l'huile minérale aux concentrations respectives de 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6% et 4,0%, et 1 paquet de papiers simplement imprégnés d'huile minérale; (Chaque paquet contient 8 papiers imprégnés);

ORGANOPHOSPHORES

Des paquets de papiers imprégnés d'insecticides peuvent être obtenus sur demande comme suit:

malathion 5%; fenthion 2,5%; fenitrothion 1,0%; propoxur 0,1%, paquets de papiers imprégnés d'huile minérale seule.

d) des feuilles (12cm x 15cm) de papier vierge pour doubler intérieurement les tubes de mise en observation;

e) 20 bagues métalliques (12 d'argent, 8 de cuivre) destinées à maintenir les papiers contre les parois des tubes. Les bagues d'argent ne serviront que pour les tubes de mise en observation et les tubes destinés aux témoins; les bagues de cuivre sont réservées aux tubes d'exposition;

f) 2 tubes d'aspiration en verre, de 12mm de diamètre intérieur, et un tube souple de 60cm de longueur;

g) 1 rouleau de ruban adhésif;

h) 1 notice d'instructions, 1 jeu de formules de rapport et 3 feuilles de papier gaussien-logarithmique pour établir les lignes de régression.

6. Technique.

a) On procède tout d'abord à l'épreuve préliminaire. Dans chaque tube de mise en observation (1), introduire une feuille de papier vierge, roulée en cylindre, de manière à doubler intérieurement le tube; la fixer par une bague d'argent. Adapter à chaque tube un manchon fileté.

b) Capturer environ 200 moustiques femelles au moyen du tube d'aspiration (fig. 3 A). Si l'on ne manipule pas les moustiques avec précaution au moment de la collecte, on risque de provoquer une mortalité élevée qui induira en erreur. Il faut récolter les insectes par lots de 10 au plus (fig. 3 B), puis les transférer doucement dans les tubes de mise en observation par l'orifice ménagé dans la plaque coulissante (fig. 3 C); on introduira ainsi 15 à 25 moustiques par tube. Tout écart par rapport à ces chiffres risquerait de compromettre la validité des résultats.

c) Une période d'attente préliminaire peut s'imposer pour éviter l'utilisation d'insectes traumatisés. A cette fin, poser les tubes verticalement, tamis en haut, pendant 1 heure au moins. Au bout de cette période, enlever les insectes traumatisés.

d) Dans chaque tube d'exposition, introduire un papier imprégné, roulé en cylindre, de manière à doubler intérieurement le tube, et le fixer au moyen d'une bague métallique. On préparera ainsi un tube pour chacune des concentrations d'insecticide fournies et un tube témoin doublé de papier simplement imprégné d'huile minérale.

e) Introduire les moustiques dans le tube d'exposition préalablement vissé sur l'extrémité libre du manchon (fig. 3 D). A cette fin, faire coulisser la plaque de manière à dégager entièrement l'ouverture, souffler doucement pour faire passer les moustiques du tube d'observation dans le tube d'exposition, puis fermer en repoussant la plaque. (S'il y a lieu, limer le cran d'arrêt de la plaque pour faciliter l'opération). Détacher le tube de mise en observation et le mettre en réserve.

f) Laisser les tubes d'exposition en position verticale, tamis en haut (fig. 3 E), pendant 1 heure sous un éclairage diffus modéré.

g) A la fin de la période d'exposition, faire passer à nouveau les moustiques dans les tubes de mise en observation en effectuant en sens inverse les manipulations décrites ci-dessus sous e). Lorsque quelques

moustiques ont été étourdis pendant la période d'exposition, tenir le tube horizontalement et tapoter légèrement pour détacher les insectes de la plaque avant de la faire coulisser. Adapter le tube de mise en observation, tirer la plaque et faire passer les moustiques dans le dernier tube en soufflant doucement; fermer en repoussant la plaque, puis détacher le tube d'exposition. Poser alors le tube de mise en observation verticalement, tamis en haut, et placer un tampon de coton humide sur le tamis (fig. 3 F). On peut remplacer les tubes d'observation par des boîtes, gobelets de carton ou autres récipients, à condition de les utiliser systématiquement.

h) Conserver les tubes de mise en observation pendant 24 heures à l'écart et à l'ombre, en un lieu où la température ne dépasse pas 30°C. Enregistrer, si possible, les températures maximale et minimale du local au cours de ces 24 heures. S'il y a lieu, protéger les tubes des fourmis en les plaçant sur un support dressé dans une cuvette remplie d'eau. Si l'air ambiant est très chaud et très sec, on peut humidifier l'atmosphère en suspendant un linge mouillé.

i) Après 24 heures, dénombrer les insectes morts. Pour enlever les moustiques morts, retirer doucement la plaque coulissante et détacher le tube avec précaution. Tout insecte incapable de marcher est compté comme mort.

Pour faciliter le dénombrement des survivants, on peut soit les étourdir en donnant une brusque secousse au tube, soit les anesthésier au chloroforme ou à l'éther. (Avoir soin d'éviter que le manchon fileté et les tubes n'entrent en contact avec eux). Les résultats seront consignés sur la formule de rapport fournie à cet effet.

j) ORGANOCHLORES

Effectuer 4 épreuves pour chaque concentration ou dose diagnostique ainsi que pour les témoins.

ORGANOPHOSPHORES

Quatre épreuves sont réalisées pour les 4 temps de contact ainsi que pour les témoins.

k) Toute épreuve dans laquelle la mortalité des témoins dépasse 20% doit être invalidée et sera recommencée.

l) Quand l'épreuve aura été exécutée 4 fois sur une même population de moustiques, on disposera normalement de données suffisantes pour établir une courbe de référence de sensibilité conformément aux indications données ci-dessous à la section 8.

7. Remarques générales.

a) Extrait de son emballage, chaque papier imprégné peut servir jusqu'à 20 fois et pendant 3 semaines, à condition que toutes les précautions possibles aient été prises pour éviter l'évaporation de l'huile minérale. A cet effet, il convient de laisser les papiers dans les tubes, dont on prendra soin de bien envelopper l'ouverture, et de placer le tout dans la boîte du nécessaire, que l'on conservera dans un endroit frais. Ne jamais utiliser un papier plus de 3 semaines après l'avoir extrait de son emballage.

b) Chaque fois qu'un papier imprégné a été retiré d'un paquet, resceller soigneusement celui-ci avec le ruban adhésif fourni. Conserver les paquets dans un endroit frais, mais non au frigorifique, le stockage à température trop basse pouvant provoquer la cristallisation des préparations plus concentrées. Eviter le stockage prolongé à température élevée. Ne pas employer les papiers passé la date limite indiquée sur l'emballage. Les papiers aux organochlorés sont utilisables pendant 5 ans à partir de la date d'imprégnation à condition que les paquets soient constamment maintenus scellés.

c) Si l'espèce de moustique étudiée est exceptionnellement peu sensible aux organochlorés, on pourra porter la période d'exposition à 2, 4, ou 8 heures. Dans tous les cas, il faudra commencer par exposer les insectes pendant 1 heure et consigner les résultats ainsi obtenus.

Pour déterminer la durée optimale d'exposition, effectuer des épreuves avec la concentration la plus élevée de la série jusqu'à obtention d'une mortalité de 100%. Poursuivre ensuite les épreuves avec toute la gamme des concentrations pour obtenir la ligne de régression concentration-mortalité.

8. Résultats.

a) L'observateur désirera peut-être établir la ligne de régression dose-mortalité d'après les résultats obtenus. A cette fin, il reportera sur le papier logarithmique fourni les résultats des épreuves faites avec chacune des quatre concentrations choisies ainsi que, dans bien des cas, ceux de l'épreuve préliminaire. La ligne de régression peut être tracée à vue; La CL_{50} - TL_{50} ou la CL_{95} - TL_{95} est alors lue sur le graphique (1). Cette ligne ne doit pas être prolongée (extrapolée) au-delà du chiffre maximal de mortalité obtenu.

b) Lorsque la mortalité des rémoins est comprise entre 5% et 20%, il convient de corriger les taux de mortalité en appliquant la formule d'Abbott:

$$\frac{\text{Mortalité des spécimens d'épreuve (en \%)} - \text{mortalité des témoins (en \%)}}{100 - \text{mortalité des témoins (en \%)}} \times 100$$

c) Le degré d'exactitude avec lequel les résultats peuvent être interprétés dépend de la sûreté des données obtenues. En réalisant l'épreuve sur le nombre maximal (25) de spécimens prévu par tube, on diminue l'effet des différences dues aux réactions individuelles. Les lignes de régression fondées sur les résultats d'expériences exécutées toutes avec le même nombre de spécimens sont les plus sûres.

9. Communication des rapports.

Il importe au plus haut point que tous les résultats obtenus par l'emploi du nécessaire d'épreuve soient communiqués à l'OMS. Les utilisateurs de ce nécessaire sont donc priés d'envoyer des exemplaires de tous leurs rapports aux adresses indiquées ci-après.

Rapports intéressant les espèces anophéliennes:

1. Organisation mondiale de la Santé, Division de l'Eradication du Paludisme, 1211 Genève, Suisse.
 2. Bureau régional OMS compétent.
 3. Centre d'exécution du projet.
- L'enquêteur conservera un exemplaire.

Rapports intéressant les espèces non anophéliennes:

1. Organisation mondiale de la Santé, Service de la Biologie des vecteurs et de la Lutte antivectorielle, 1211 Genève, Suisse.
 2. Bureau régional OMS compétent.
- L'enquêteur conservera deux exemplaires.

(1): La CL_{50} et la CL_{95} sont les concentrations d'insecticide auxquelles, respectivement, 50% et 95% des spécimens sont tués.

La TL_{50} et la TL_{95} représentent respectivement les temps d'exposition pour lesquels 50% et 95% des spécimens sont tués.

ANNEXE II. Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides.

1. INTRODUCTION.

Pour détecter l'apparition d'une souche de moustiques résistante aux insecticides, il faut établir une courbe de référence pour l'espèce en cause, soit avant toute application en grand d'insecticides, soit avec des spécimens provenant d'une zone non traitée. Quand on entreprend des traitements larvicides réguliers contre les moustiques, il convient de déterminer dès que possible le degré normal de sensibilité des larves. A cet effet, on exécutera plusieurs épreuves (8 au minimum) en des saisons et en des lieux différents, de manière à évaluer les variations biologiques normales. Les épreuves seront ensuite répétées à intervalles réguliers, afin de mettre en évidence toute diminution importante de la sensibilité.

On tiendra compte de tous les traitements insecticides qui auraient été effectués antérieurement dans la zone considérée, soit pour combattre les moustiques, soit à des fins agricoles importantes.

Il convient de souligner que l'épreuve décrite ci-après n'a pas été conçue pour évaluer sur place l'efficacité relative des insecticides utilisés.

Doses diagnostiques.

Pour une surveillance régulière de la résistance il n'est pas indispensable de recourir à toutes la série des concentrations nécessaires à l'établissement de la courbe de sensibilité. On peut utiliser la dose diagnostique tuant tous les individus normalement sensibles.

Les tests à la concentration diagnostique devront être exécutés 4 fois avec 25 larves. La présence de survivants à cette concentration sera rarement attribuée à une variabilité normale, pourvu que l'âge physiologique, les conditions des larves et les conditions expérimentales soient les mêmes que ceux utilisés lors de l'établissement de la courbe de référence de sensibilité.

Les individus qui survivront lors de ces épreuves seront probablement des spécimens résistants.

Les concentrations diagnostiques ont été déterminées sur des souches de laboratoire sensibles (Anopheles et Culicinae).

DDI' = 0,5 ppm

HCH = 0,5

dieldrine = 0,1

malathion: 3,125

fenitrothion = 0,125 (excepté A.sacharovi)

fenthion = 0,05

parathion = 0,125

temephos = 0,125

chlorpyrphos = 0,025 (excepté A.sacharovi)

Ces données ont été obtenues avec des larves au stade IV à 23°C. Il est possible que ces résultats soient différents pour les larves sauvages et dans des conditions naturelles.

Elles sont données à titre indicatif. Un contrôle de ces données devra être fait sur terrain avant de les utiliser.

2. Composition du nécessaire d'épreuve.

Le nécessaire comprend:

ORGANOCHLORES

a) 3 insecticides en solution éthanolique: DDT (isomère-p,p'), gamma-HCH ou lindane (isomère gamma pur) et dieldrine (HEOD) - chacun d'eux étant fourni à 5 concentrations différentes. La concentration indiquée sur chaque flacon - soit 0,004, 0,02, 0,10 ou 2,50 ppm - est celle qu'on obtient en diluant 1 ml de solution éthanolique avec 249 ml d'eau. Les préparations sont fournies en flacons de 50 ml et le nécessaire comporte en outre 50 ml d'éthanol pour les témoins.

ORGANOPHOSPHORES

b) les insecticides à étudier, chacun étant fourni en solution éthanolique à 4 concentrations différentes, couvrant un intervalle convenable de concentrations. La concentration indiquée sur chaque flacon est celle qu'on obtient en diluant 1 ml de solution éthanolique avec 249 ml d'eau. On peut par exemple obtenir les composés suivants aux concentrations indiquées (en ppm): Abate (0,025, 0,005, 0,001, 0,0002), bromophos (0,125, 0,025, 0,005, 0,001), Dursban (0,025, 0,005, 0,001, 0,0002), fénitrothion (0,125, 0,025, 0,005, 0,001), fenthion (0,625, 0,125, 0,025, 0,005), malathion (3,125, 0,625, 0,125, 0,025), et parathion (0,125, 0,025, 0,005, 0,001). Les préparations sont fournies en flacons de 50 ml et le nécessaire comporte en outre 50 ml d'éthanol pour les témoins.

c) 4 pipettes de 1 ml, soit une pour chacun des insecticides et une pour l'éthanol. Chaque pipette est pourvue d'une petite poire d'aspiration.

d) 2 compte-gouttes oculaires pour le transfert des larves;

e) les accessoires suivants, qui serviront à confectionner un tamis: 2 anses métalliques, un morceau de gaze de nylon et un tube de colle. Pour confectionner le tamis, on peut procéder de la manière suivante: découper deux morceaux de gaze d'environ 5 cm x 5 cm; enduire de colle l'un des rebords de l'anse et y appliquer un carré de gaze; retourner l'ensemble et répéter l'opération sur le rebord opposé; ajouter encore un peu de colle de manière à bien joindre les deux carrés de nylon, puis, après séchage, découper à l'aide d'une paire de ciseaux la gaze qui dépasse le contour de l'anse. Le nécessaire contient assez de gaze de nylon pour remplacer éventuellement le tamis.

L'utilisateur doit fournir lui-même les vases nécessaires à la collecte des moustiques et à l'exécution des épreuves;

f) 1 notice d'instructions, 1 jeu de formules de rapport et 3 feuilles de papier gaussien-logarithmique pour établir les lignes de régression.

3. Technique.

a) Pour exécuter une épreuve complète avec un insecticide, on recueillera sur le terrain assez de larves pour être en mesure d'en trier environ 300 de la même espèce. Les larves choisies devront être au troisième ou au début du quatrième instar; jusqu'au moment de leur utilisation pour l'épreuve, elles seront conservées dans l'eau où elles auront été recueillies. On éliminera toute larve présentant des anomalies, par exemple un aspect duveteux dû à la présence de parasites fixés à la surface du corps. Les larves seront réparties par lots de 20 à 25 dans 12 petits béciers contenant chacun 25 ml d'eau. Le transfert s'effectuera au moyen soit du tamis, soit d'un compte-gouttes oculaire; pendant l'opération, les larves seront légèrement rincées à l'eau claire.

b) Dans chacun des 12 vases de verre (bocaux, bols ou béciers de 500 ml), d'environ 7,5 à 10 cm de diamètre, verser 225 ml d'eau. La forme des vases doit être telle que la hauteur de l'eau soit comprise entre 2,5 et 7,5 cm. On peut utiliser soit de l'eau distillée, soit de l'eau de pluie, de puits, de rivière ou d'un réseau de distribution, aussi indemne que possible de chlore et d'impuretés organiques. Il ne faut pas oublier que l'eau distillée du commerce contient parfois des traces de métaux lourds toxiques. Certaines espèces de larves - par exemple les larves de moustiques des marais salants ou de moustiques qui gâtent dans les arbres creux - peuvent souffrir d'un transfert dans une eau relativement pure, ce qui se traduit par une mortalité élevée des témoins; en pareil cas, on utilisera l'eau du gîte larvaire (à condition qu'elle ne contienne pas d'insecticide), soigneusement débarrassée de tous débris. On notera la température moyenne de l'eau, qui devra être d'environ 25°C, et en aucun cas ne devra être inférieure à 20°C ni supérieure à 30°C.

c) Préparer les solutions d'épreuve en introduisant à la pipette dans chaque vase de verre, sous la surface de l'eau, 1 ml de la solution insecticide normalisée choisie; agiter ensuite énergiquement pendant 30 secondes avec la pipette. Lorsqu'on prépare une série de solutions de concentrations différentes, commencer par la plus faible. Préparer 2 vases identiques pour chaque concentration ainsi que 2 vases témoins; ceux-ci contiennent 225ml d'eau additionnée de 1 ml d'éthanol.

d) Quinze à trente minutes après avoir préparé les solutions d'épreuve, y introduire les larves de moustiques en versant le contenu des petits béciers dans les vases.

e) Après 24 heures, procéder au dénombrement des larves mortes. Pour calculer le pourcentage de mortalité à chaque concentration, on additionnera le nombre des larves moribondes et le nombre des larves mortes dans chaque groupe de deux vases. On comptera comme mortes les larves qui ne bougent pas quand on les touche avec une aiguille dans le siphon ou la région cervicale. On considérera comme moribondes les larves incapables d'atteindre la surface (dans un laps de temps raisonnable) ou de manifester la réaction de plongée caractéristique quand on agite l'eau; ces larves peuvent aussi présenter une décoloration, des positions insolites, des spasmes, des mouvements désordonnés ou un état de rigidité.

f) Les larves qui se changent en nymphes pendant l'épreuve sont à rejeter. Quand plus de 10% des larves témoins deviennent nymphes au cours de l'épreuve, celle-ci doit être entièrement annulée. Toute épreuve dans laquelle la mortalité des témoins atteint ou dépasse 20% doit être invalidée et sera recommencée.

g) Il importe d'obtenir au moins trois chiffres de mortalité compris entre 10% et 90%. Pour certaines espèces, il est impossible de parvenir à ce résultat avec les seules concentrations normalisées fournies dans le nécessaire d'épreuve; il faut alors préparer des concentrations additionnelles tant inférieures que supérieures à 0,004 ppm. On peut préparer des concentrations intermédiaires en diluant dans de l'éthanol pur une partie d'une solution normalisée (on obtiendra par exemple une concentration de 0,01 ppm en diluant la solution normalisée à 0,02 ppm dans un volume égal d'éthanol, avant d'ajouter 1 ml de la solution à l'eau contenue dans le vase d'épreuve). Si l'on a besoin de concentrations plus fortes, on pourra les demander à l'OMS.

h) Quand l'épreuve aura été exécutée 4 fois sur une même population de larves de moustiques, on disposera normalement de données suffisantes pour établir une courbe de référence de sensibilité. Les résultats seront consignés sur la formule de rapport fournie à cet effet. Des exemplaires du rapport établi seront communiqués conformément aux indications données à la page 23.

4. Remarques générales.

a) Le titre des solutions normalisées fournies se modifierait si l'alcool s'évaporait. Les flacons doivent donc être hermétiquement bouchés après usage. On n'utilisera plus les solutions de volume inférieur à 5 ml. L'OMS fournira sur demande des solutions normalisées fraîches.

b) Les vases d'épreuve doivent être minutieusement nettoyés après usage, de manière à éliminer toute trace d'insecticide. Ils seront rincés à fond, frottés avec un détersif et de l'eau (ou nettoyés au mélange sulfo-chromique), puis rincés à nouveau. Les pipettes seront minutieusement nettoyées à l'acétone ou à l'alcool.

5. Résultats.

a) L'observateur désirera peut-être établir la ligne de régression dose-mortalité d'après les résultats obtenus. A cette fin, il reportera les résultats sur le papier gaussien-logarithmique fourni. La ligne de régression peut être tracée à vue; la CL_{50} ou la CL_{95} est alors lue sur le graphique (1). Cette ligne doit pas être prolongée (extrapolée) au-delà du chiffre maximal de mortalité obtenu.

b) Lorsque la mortalité des témoins est comprise entre 5% et 20%, il convient de corriger les taux de mortalité en appliquant la formule d'Abbott:

$$\frac{\text{Mortalité des spécimens d'épreuve (en \%)} - \text{mortalité des témoins (en \%)}}{100 - \text{mortalité des témoins (en \%)}} \times 100$$

c) Le degré d'exactitude avec lequel les résultats peuvent être interprétés dépend de la sûreté des données obtenues. En réalisant l'épreuve sur le nombre maximal (25) de spécimens prévu par vase, on diminue l'effet des différences dues aux réactions individuelles. Les lignes de régression fondées sur les résultats d'expériences exécutées toutes avec le même nombre de spécimens sont les plus sûres.

6. Communication des rapports.

Il importe au plus haut point que tous les résultats obtenus par l'emploi du nécessaire d'épreuve soient communiqués à l'OMS. Les utilisateurs de ce nécessaire sont donc priés d'envoyer des exemplaires de tous leurs rapports aux adresses indiquées ci-après:

Rapports intéressant les espèces anophéliennes:

1. Organisation mondiale de la Santé, Division de l'Eradication du paludisme, 1211 Genève, Suisse.
 2. Bureau régional OMS compétent.
 3. Centre d'exécution du projet.
- L'enquêteur conservera un exemplaire.

Rapports intéressant les espèces non anophéliennes:

1. Organisation mondiale de la Santé, Service de la Biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle, 1211 Genève, Suisse.
 2. Bureau régional OMS compétent.
- L'enquêteur conservera deux exemplaires.

ANNEXES I et II d'après WHO/VBC/7581, 75582, 75583).

(1) La CL_{50} et la CL_{95} sont les concentrations d'insecticide auxquelles, respectivement, 50% et 95% des spécimens sont tués.