

| | | |
|--|---|--|
|  <p>IRD Institut de Recherche pour le Développement FRANCE</p> | <p>UMR Mivegec Montpellier Centre IRD 911 avenue Agropolis B.P. 64501 34394 Montpellier cedex 5</p> |  <p>MIVEGEC Maladies Infectieuses et Vecteurs Écologie, Génétique, Evolution et Contrôle</p> |
| <p>UMR Mivegec Vectopole</p> | <p>Laboratoire insecticides</p> | <p>Tél. : 04 67 41 63 89</p> |

Manuel du laboratoire de bio essais

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| SOMMAIRE | 2 |
| OBJET | 3 |
| PREPARATION DES SOLUTIONS D'IMPREGNATION POUR PAPIER | 6 |
| PREPARATION DES SOLUTIONS INSECTICIDE A BASE D'ETHANOL | 7 |
| PREPARATION DES SOLUTIONS A BASE D'ACETONE | 8 |
| PREPARATION DES SOLUTIONS AQUEUSES | 9 |
| IMPREGNATION DES PAPIERS | 11 |
| IMPREGNATION DES MOUSTIQUAIRES | 12 |
| IMPREGNATION DES SUBSTRATS | 13 |
| PROTOCOLE TEST EN TUBE OMS | 16 |
| PROTOCOLE TEST EN TUNNEL DE JOUR | 18 |
| PROTOCOLE TEST LARVAIRE | 21 |
| TEST EN CÔNE | 23 |
| APPLICATION TOPIQUE | 25 |
| TEST D'IRRITABILITE | 27 |
| PROTOCOLE TEST D'INHIBITION DU REPAS SANGUIN | 28 |
| PROTOCOLE TEST EN CHAMBRE CIRCULAIRE | 29 |
| TEST DE RESISTANCE AU LAVAGE | 32 |
| SUIVI FECONDITE /FERTILITE | 32 |
| PROTOCOLES DES ESSAIS BIOCHIMIQUES, POUR LES MOUSTIQUES | 35 |
| DETERMINATION GENETIQUE D'ALLELE DE RESISTANCE SUR EXUVIE NYMPHALE | 48 |

TABLEAU D'ÉVOLUTION

Création le 24 avril 2003.
Revu le 17 septembre 2020.
Prochaine revue avant le 17 septembre 2022.
Modifications pages 3 à 49

| Version | Date | Objet | Rédaction | Vérification | Approbation |
|---------|------------|-------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | 24/04/2003 | Création | L. FINOT | L. FINOT | J.-M. HOUGARD |
| 2 | 20/01/2004 | Modification suite RdD | L. FINOT | L. FINOT | J.-M. HOUGARD |
| 3 | 30/01/2007 | Modification protocole | S. DUCHON | L. FINOT | D. FONTENILLE |
| 4 | 10/03/2008 | Modification protocole | S. DUCHON | L. FINOT | D. FONTENILLE |
| 5 | 10/10/2008 | Ajout protocole | J. BONNET | L. FINOT | F. CHANDRE |
| 6 | 20/05/2009 | Modification | L. FINOT | L. FINOT | F. CHANDRE |
| 7 | 27/04/2012 | Actualisation Mivegec | M. Rossignol | M. Rossignol | F. CHANDRE |
| 8 | 15/05/2013 | Modification de protocole | M. Rossignol | M. Rossignol | F. CHANDRE |
| 9 | 09/12/2016 | Actualisation vectopole | M. Rossignol | M. Rossignol | F. CHANDRE |
| 10 | 09/07/2018 | Ajout protocole | S. cornelie | M. Rossignol | F. CHANDRE |
| 11 | 26/07/2019 | Ajout protocole | M. Rossignol | M. Rossignol | F. CHANDRE |
| 12 | 16/09/2020 | Mis à jour et Ajout protocole | M. Rossignol | S. Cornélie | F. CHANDRE |

OBJET

Ce manuel définit les conditions et les moyens nécessaires pour la bonne réalisation des tests insecticides et des manipulations faites au laboratoire insecticide. Il concerne :

- La préparation des solutions d'insecticides, des supports pour les tests ainsi que les moyens utilisés pour leur conservation ;
- Les protocoles de tests ;
- Les modalités de traitement des anomalies détectées en cours de manipulation.

Celui-ci s'applique à tout le personnel travaillant au laboratoire insecticides niveau L0 du Vectopole (titulaires, CDDs, stagiaires, étudiants, etc.) et ayant été habilité pour pratiquer les manipulations décrites ci-après. Celles-ci sont recensées dans le tableau des compétences.

Réception

Dès réception d'un produit à tester (insecticides ou support imprégné d'insecticide), celui-ci est enregistré dans le « cahier de réception des échantillons pour test insecticide ». Pour chaque produit entrant il est noté : la date de réception, la référence, la référence client lorsqu'elle existe, le nom du client, le type et le nombre d'échantillons, le lieu de stockage et les remarques éventuelles. Chaque produit est étiqueté puis stocké selon les conditions de conservation du matériel (étagères ou réfrigérateur)

Planification

La planification des tests insecticides est particulièrement importante car leur réalisation dépend avant tout de la quantité de moustiques disponibles. Le planning des tests doit tenir compte du nombre et du type de tests à réaliser ainsi que des délais exigés par les clients ou les programmes de recherche. Il est élaboré et réactualisé par le Directeur du laboratoire au cours de réunions réunissant l'ensemble des membres de l'équipe LAV (lutte anti-vectorielle).

L'opérateur chargé du travail établit la demande de moustiques dont il a besoin un mois à l'avance par courrier électronique au responsable insectarium. Il s'occupe de la préparation des solutions d'insecticides et des supports imprégnés utiles aux manipulations. Il effectue les tests et remet son rapport au Responsable du Centre Collaborateur et de l'équipe LAV.

Identification

Au cours des différentes manipulations tous les produits ou supports testés sont identifiés au moyen d'une étiquette rappelant le numéro d'identification du produit et sa référence échantillon. Ces références sont identiques à celles répertoriées dans le fichier de suivi des tests insecticides (planning test). Les échantillons en cours de test sont stockés dans la cellule de test insecticide en fonction du lieu de stockage nécessaire.

Hygiène et sécurité

Tous les déchets solides (gants, pointes, pipettes, papiers imprégnés, etc.) issus des manipulations doivent être jetés dans des « seaux blancs » prévus à cet effet.

Les déchets liquides (solutions insecticides) sont jetés dans des bidons réservés à cet usage. Les bidons et les seaux doivent être clairement identifiés. Les déchets biologiques (cadavre de moustiques) sont à éliminer dans les sacs jaunes biohazard.

Les sacs jaunes sont à éliminer dans la soute à déchets biologiques et les bidons pleins et les seaux blancs sont évacués dans la soute à déchets chimique sous la supervision du correspondant déchet. Les procédures déchets sont affichés dans les laboratoires disponibles sous S:\UNITES\SS_224\Laboratoire\Hygiène et sécurité et en annexes ce manuel.

Contrôles en cours

La préparation des solutions insecticides demande une attention particulière, les concentrations utilisées étant souvent très faibles. Le port de gants à usage unique pendant les manipulations d'insecticides est indispensable, autant pour la sécurité des manipulateurs, que pour éviter de contaminer les plans de travail.

Lors de la lecture des tests, si la mortalité des témoins est comprise entre 0 et 20%, le test est validé, si celle-ci est comprise entre 0 et 20 % la mortalité des traités est corrigée par la formule d'Abbott qui donne une mortalité corrigée :

$$Mc = \frac{\% \text{mortalité Traités} - \% \text{mortalité Témoins}}{100 - \% \text{mortalité Témoins}} * 100$$

Lorsque cette mortalité est supérieure à 20 % le test n'est pas validé et doit être recommandé. Il est alors impératif de déterminer la cause de cette mortalité anormale avant de reprendre l'expérimentation.

Certains tests exigent une mortalité des témoins inférieures ou égale à 10% cela est précisé dans les protocoles.

Décontamination

Après chaque série de tests il est indispensable de procéder à la décontamination du plan de travail et de l'étuve. Le nettoyage se fait avec de l'éthanol. Le matériel utilisé (tubes OMS, cônes, aspirateur à bouche...) est décontaminé par trempage dans un bain d'une solution de TFD4 pendant 24 heures. Rincer le matériel après la décontamination par 3 rinçages successifs.

Toute anomalie constatée lors des manipulations est enregistrée sur la fiche de test. Si celle-ci met en cause le fonctionnement même des tests, l'opérateur ouvre une fiche d'amélioration qu'il transmet au responsable qualité.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS INSECTICIDES

La préparation des solutions insecticides à lieu dans la pièce L02

Les matières actives sont stockées en L02 dans le frigidaire dédié sous paillasse miv 310.

Les formulations sont stockées en L01 dans le frigidaire dédié sous paillasse miv 306.

Les solutions insecticides dilués en solvant sont stockées dans l'armoire réfrigérée ventilé miv307.

Les flacons de préparations des solutions doivent être étiquetés avec le nom de l'insecticide, le nom du solvant, sa concentration, la date de préparation et le nom de l'opérateur.

PREPARATION DES SOLUTIONS D'IMPREGNATION POUR PAPIER

Cette instruction définit le mode opératoire pour la préparation des solutions qui servent à l'imprégnation des papiers utilisés pour les tests en tube OMS et pour les tests d'irritabilité.

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIÉES (SEAUX BLANCS) DES LA FIN DE LA
PRÉPARATION.**

Les solutions destinées à l'imprégnation sont préparées à partir de la matière active. Mais celle-ci est rarement pure. Après détermination des doses qui seront utilisée pour les tests, la dose la plus élevée servira de solution mère, les solutions filles sont obtenues par dilutions successives.

- Déterminer la quantité d'insecticide nécessaire pour obtenir la concentration voulue en fonction de son degré de pureté.
- Peser l'insecticide dans une coupelle en papier d'aluminium. Imprimer la pesée et la coller dans le cahier de manipulation ou dans le dossier de travail.
- Introduire la coupelle dans un flacon. Coller sur ce dernier une étiquette identifiant l'insecticide, la concentration et la date de fabrication.
- Calculer au moyen du programme sous Excel le volume du mélange acétone-silicone (réf. Dow Corning DC 556) pour obtenir la concentration désirée.
- Si des solutions filles doivent être préparées, prélever dans le flacon contenant la concentration la plus élevée le volume de solution insecticide voulue. Ajouter le mélange acétone-silicone nécessaire. Recommencer jusqu'à obtention de toutes les concentrations nécessaires pour les tests.
- Conserver les solutions dans l'armoire réfrigérée ventilé miv307 à $6^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant six mois maximum.

Exemple :

| Imprégnation des papiers imprégnés | | |
|--|-----------------|-------------------|
| nom de l' insecticide | Permethrine | date : 09/12/2016 |
| ref insecticide | B.9725.219 | opérateur : Luc |
| Concentration (mg/m ²) | 364 | variable |
| concentration en % | 1 | |
| nombre de papier | 10 | |
| degré de pureté | 94.4 | |
| poids de MA à peser (mg) | 69.40678 | |
| volume d'acétone/ silicone à ajouter (ml) | 20 | |
| pesée | 75.9 | |
| volume corrigé à ajouter | 21.9 | |

Contrôles :

En cas de doute sur une solution (tare incertaine de la balance, quantité du mélange acétone-silicone, etc.) jeter la préparation et la refaire.

PREPARATION DES SOLUTIONS INSECTICIDE A BASE D'ETHANOL

Cette instruction définit le mode opératoire pour la préparation des solutions insecticide à base d'éthanol utilisées lors des tests sur larves ou pour les sélections des souches résistantes.

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIÉES (SEAUX BLANCS) DES LA FIN DE LA
PRÉPARATION.**

Les solutions à base d'éthanol sont préparées à partir de matière active. Mais celle-ci est rarement pure. Les solutions larvaires sont préparées dans des flacons en verre et conservées dans ceux-ci. La solution mère est généralement à 1000 mg/l. Les solutions filles sont obtenues par dilution successive de 10 en 10, 100 mg/l, 10 mg/l, 1 mg/l, 0,1 mg/l, etc.

Calculer la quantité d'insecticide (produit technique) à utiliser pour la solution mère en fonction du degré de pureté.

Peser celui-ci dans une coupelle d'aluminium. Imprimer la pesée et la coller dans le cahier de manipulation ou le dossier de travail. Introduire la coupelle dans le flacon.

Ajouter la quantité d'alcool nécessaire pour obtenir la concentration désirée, faire les dilutions successives en prélevant avec une pipette 1/10^{ème} du volume final que l'on veut obtenir. Compléter avec 9/10^{ème} d'alcool.

- Conserver les solutions dans l'armoire réfrigérée ventilé miv307 à 6 °C ± 3 °C pendant six mois maximum.
- .

Exemple :

Préparation d'une solution mère pour test larvaire (solution dans l'éthanol)

| | | | |
|--|-------------|---------------|------------|
| nom de l' insecticide | Permethrine | date | 05/06/2003 |
| ref insecticide | B.9725.219 | opérateur | steph |
| concentration de la solution mère à préparer | mg/l | 1000 | variable |
| volume à préparer | ml | 100 | |
| quantité à peser | mg | 100 | |
| degré de pureté | % | 94,4 | |
| poids de MA à peser (mg) | mg | 105,93 | |
| volume d'éthanol à ajouter | ml | 100,0 | |
| pesée | mg | 114 | |
| volume corrigé à ajouter | ml | 107,62 | |

Contrôles :

En cas de doute sur une solution (tare incertaine de la balance, quantité d'éthanol, etc.) jeter la préparation et la refaire.

PREPARATION DES SOLUTIONS A BASE D'ACETONE

Cette instruction définit le mode opératoire pour la préparation des solutions à base d'acétone utilisées pour les applications topiques.

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIEES (SEPTIBOX) DES LA FIN DE LA
PREPARATION.**

Les solutions utilisées pour les applications topiques sont préparées dans des flacons en verre et conservées dans ceux-ci. La solution mère est généralement à 5000 mg/l. Les solutions filles sont obtenues par dilution successive aux doses recherchées pour les tests.

Préparer l'insecticide (produit technique) que l'on doit utiliser pour la solution en contrôlant le degré de pureté. Peser celui-ci dans une coupelle d'aluminium. Imprimer la pesée et la coller dans le cahier de manipulation ou le dossier de travail. Introduire la coupelle dans le flacon.

Ajouter la quantité d'acétone nécessaire pour obtenir la concentration désirée.

Les concentrations de solution insecticide utilisées pendant les manipulations sont préparées dans des flacons de 4 ml. Les dilutions successives sont obtenues en prélevant avec une pipette la quantité de solution insecticide, et en la complétant avec la quantité d'acétone nécessaire pour obtenir le volume final souhaité.

- Conserver les solutions dans l'armoire réfrigérée ventilé miv307 à $6^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant six mois maximum.

Contrôles

En cas de doute sur une solution (tare incertaine de la balance, quantité d'acétone, etc.) jeter la préparation et la refaire.

PREPARATION DES SOLUTIONS AQUEUSES

Cette instruction définit le mode opératoire pour la préparation des solutions aqueuses utilisées pour les imprégnations des moustiquaires ou des substrats avec le pulvérisateur F2 plus 1.5l Berthoud.

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIÉES DES LA FIN DE LA PRÉPARATION.**

Les solutions utilisées pour les imprégnations des moustiquaires ou des substrats imprégnés à le pulvérisateur F2 plus 1.5l Berthoud sont préparées dans des flacons en verre et conservées dans ceux-ci. La solution mère est la dose la plus élevée utilisée pour les tests. Les solutions filles sont obtenues par dilution successive aux doses recherchées pour les tests.

Les formulations d'insecticide utilisées pour les préparations de moustiquaires peuvent se présenter sous différente forme (poudre mouillable, micro-capsule, etc.), leur point commun étant d'être soluble dans l'eau.

- Déterminer la quantité de formulation nécessaire à la préparation de la solution mère en tenant compte de la concentration d'insecticide contenue dans celle-ci et de la quantité de solution à obtenir.
- Peser la quantité voulue dans une coupelle d'aluminium ou une coupelle de pesée. Imprimer la pesée et la coller dans le cahier de manipulation ou le dossier de travail. Dans le cas de formulation liquide, prélever le volume désiré au moyen d'une pipette. Introduire la formulation d'insecticide dans le flacon.
- Ajouter la quantité d'eau nécessaire pour obtenir la concentration désirée.
- Les solutions filles sont obtenues par dilutions successives en prélevant avec une pipette le volume nécessaire de la de solution mère. Compléter avec la quantité d'eau nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée.

Les solutions aqueuses sont des préparations instantanées à utiliser de suite, il n'y a pas de conservation de celles-ci.

Contrôles

En cas de doute sur une solution (tare incertaine de la balance, quantité d'eau ajoutée, quantité de préparation prélevée pour une solution fille, etc.) jeter la préparation et la refaire.

PRÉPARATION

DES SUBSTRATS

IMPREGNATION DES PAPIERS

Cette instruction définit le mode opératoire pour la préparation des papiers imprégnés utilisés au laboratoire pour les tests en tubes OMS ou les tests d'irritabilité.

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIÉES (SEPTIBOX) DES LA FIN DE LA
PRÉPARATION.**

L'imprégnation se fait sur du papier Whatman filtres qualitatifs standard (réf. 1002 917), ou à défaut, le Whatman N°1 (Chromatography paper 1 Chr N°. 3001 917) découpé au format 12 cm par 15 cm.

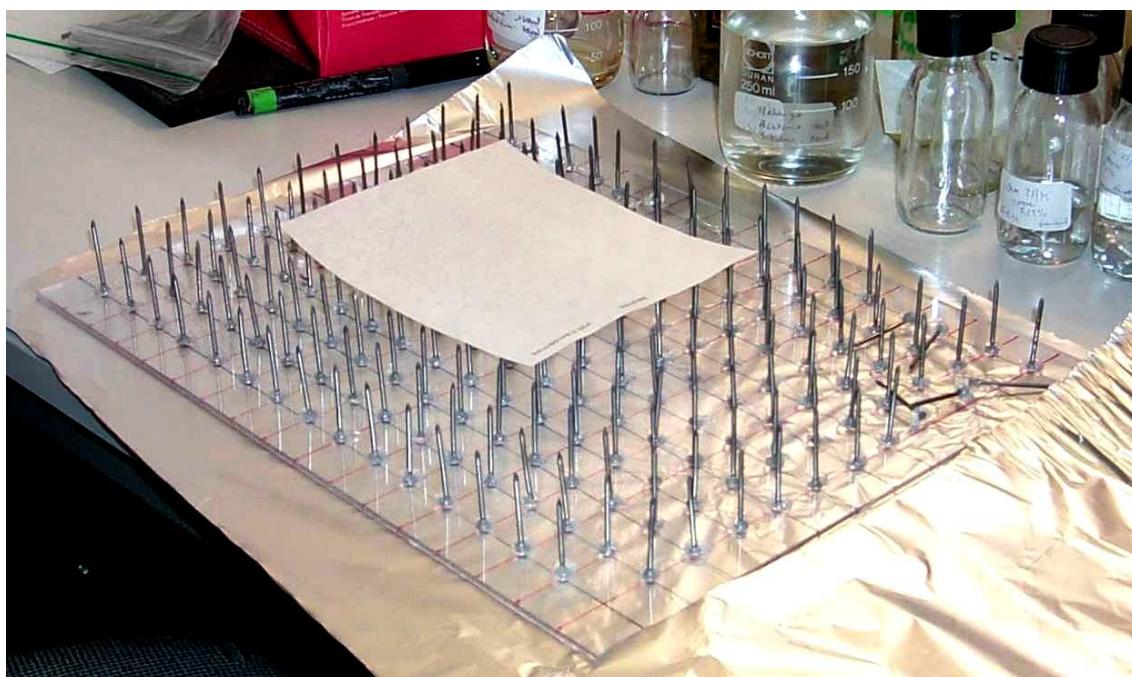
Inscrire sur le papier en haut sur la largeur dans l'ordre côté opposé à la face imprégnée :

- l'insecticide,
- la concentration,
- la date d'imprégnation.

Placer le papier (inscription non visible) sur une "planche à clous" disposés les pointes vers le haut. Il faut qu'il y ait suffisamment de clous pour que le papier ne fasse pas de poches au moment de l'imprégnation. Déposer 2 ml de solution d'insecticide (voir l'instruction des préparations des solutions d'imprégnation) en goutte à goutte au moyen d'une pipette de 2 ml, en répartissant la solution sur toute la surface de manière homogène.

Laisser sécher une nuit sur une papier aluminium.

- Envelopper les papiers par dose en le mettant 2 par é face imprégnée contre face imprégnée dans un papier d'aluminium, puis stocker dans un ziploc au réfrigérateur à 4 °C ± 3 °C en L05.
- Indiquer sur le papier d'aluminium l'insecticide, la concentration et la date d'imprégnation, le nombre de papier et le nom de l'opérateur.



IMPREGNATION DES MOUSTIQUAIRES

Cette instruction définit le mode opératoire pour la préparation des échantillons de moustiquaire qui seront utilisées au laboratoire pour les tests cônes OMS ou les tests d'irritabilité.

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIÉES (SEPTIBOX) DES LA FIN DE LA
PRÉPARATION.**

Pour un tissu ou un tulle moustiquaire, on calcule tout d'abord le taux de rétention par unité de surface, à partir d'une surface de 1 m² si la taille de l'échantillon le permet, sinon ¼ de m². Pour ce faire, il faut laver l'échantillon pour enlever d'éventuels apprêts qui masquerait le pouvoir de rétention réel de l'échantillon.

La pesée de l'échantillon à sec, puis après trempage dans l'eau pendant 5 minutes, permet de déterminer le volume de rétention d'eau par m².

Les formulations commerciales d'insecticides se présentant sous forme de formulation soluble dans l'eau, la solution fille sera obtenue à partir de dilutions successives dans de l'eau osmosée.

L'imprégnation se fait dans une boîte de Pétri dans laquelle l'échantillon 0.25m x 0.25m soit 0.0625 m² aura été préalablement plié. La solution d'imprégnation, dont le volume correspond à la capacité spécifique d'absorption de l'échantillon, est ensuite déposée en goutte à goutte le plus régulièrement possible à l'aide d'une pipette.

Presser le tissu avec des doigts gantés, et ce à plusieurs reprises pour bien faire pénétrer l'insecticide dans toutes les couches du tissu (on s'assurera qu'il ne reste pas de solution non absorbée au fond de la boîte de Pétri).



Laisser sécher une semaine à l'air libre avant d'utiliser la moustiquaire pour un test. L'échantillon sera ensuite conditionné après le test dans un papier aluminium sur lequel sera inscrit l'insecticide, la concentration et la date d'imprégnation. Le tout est placé dans une pochette plastique scellée et conservée à température ambiante ou à 4°C pour une éventuelle analyse de résidu.

IMPREGNATION DES SUBSTRATS

Cette instruction décrit le mode opératoire pour les imprégnations de substrats (plaques de bois, plaque de boue, plaque de plâtre ou autres) au moyen d'un dispositif à base d'un pulvériseur à pression préalable de marque « Berthout » référence « F2 plus ».

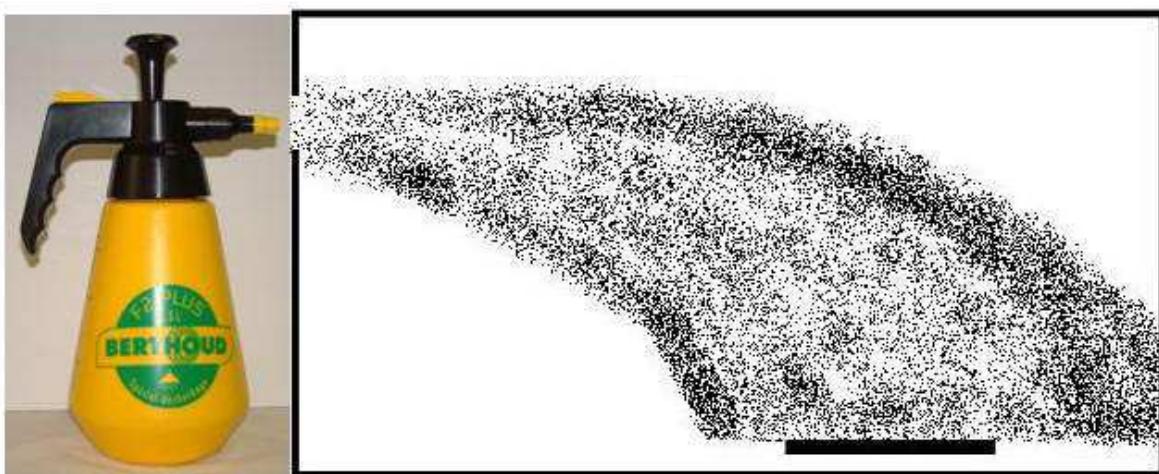
Ce dispositif vient remplacer l'utilisation de la tour de Potter. (Cette dernière ayant posée des problèmes lors d'imprégnation de certaines formulations).

**ATTENTION : LE PORT DE GANTS PENDANT LA MANIPULATION D'INSECTICIDE EST OBLIGATOIRE.
JETER LES GANTS DANS LES POUBELLES APPROPRIÉES DÈS LA FIN DE LA PRÉPARATION.**

L'objectif de ce dispositif est de se rapprocher des procédures et des conditions de terrain lors des imprégnations intra-domiciliaire. Nous utiliserons donc des pulvérisateurs à pression préalable avec jet réglable et à pulvérisation continue. Un étalonnage est réalisé avant chaque série d'imprégnation afin d'ajuster la concentration de la solution à préparer. On vérifiera également l'homogénéité de l'imprégnation.

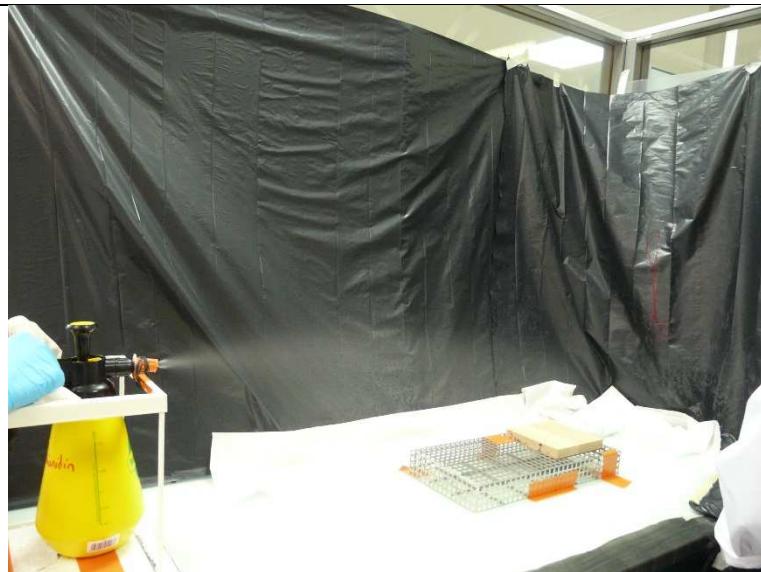
Procédure :

L'utilisation d'une chambre de pulvérisation est conseillée afin de limiter les problèmes de contaminations ultérieurs et afin d'éviter les interactions extérieures (courant d'air en particulier) et cet manipulation peut être réaliser dans la pièces des tunnels L03 dont les pmurs doivent être préalablement protégé. Schéma ci-dessous



Le volume utilisé sera toujours compris entre 0,5 et 0,4 litre et la mise sous pression se fera grâce à 50 pompages.

- 1) Détermination de la zone d'imprégnation : pratiquer des imprégnations successives avec colorants afin de déterminer la zone la plus homogène. (Environ à 0.50 mètres)
- 2) Évaluation de la quantité récupérer sur le support : peser à sec 10 morceaux de papiers filtres de dimension connue (ex 12X15) . Pulvériser pendant 3 secondes puis peser immédiatement le papier ainsi humide. Ceci permettra de connaître la quantité de liquide récupéré par unité de surface et ainsi de calculer la concentration de solution insecticide à préparer pour imprégner les supports à la concentration souhaitée.
- 3) Imprégnation des supports : 10 supports pourront être imprégnés successivement ensuite ouvrir le pulvérisateur puis remettre sous pression par 50 pompages. Les support seront pesés avant et après la pulvérisation afin de faire un contrôle gravimétrique de la pulvérisation. Vérifier que le volume dans le pulvérisateur soit toujours compris entre 0,4 et 0,5 litre.



ATTENTION : il est conseillé de retirer l'excès de solution dans la chambre de pulvérisation lors que cela est nécessaire.

Commencer les imprégnations par les témoins, puis aller de la concentration insecticide la plus faible vers la plus forte. Bien nettoyer le pulvérisateur entre chaque concentration et/ou chaque insecticide.

Les échantillons sont séchés à l'horizontale à température ambiante puis testés. S'il s'agit d'une étude de rémanence, les substrats sont stockés dans les conditions de température et d'humidité définie par le protocole.



PROTOCOLES

DES TESTS

INSECTICIDES

PROTOCOLE TEST EN TUBE OMS¹

1. Principe du test :

Le test en tube a pour but d'évaluer et de suivre sur des moustiques adultes le niveau de sensibilité à un insecticide (mesure de la résistance). Ce type de test permet également de comparer l'efficacité de différents insecticides vis à vis d'une espèce donnée ou inversement la sensibilité de plusieurs espèces de moustiques vis à vis d'un insecticide donné. Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un pyréthrinoïde, en termes de mortalité et d'effet Knock Down (effet KD). Il permet également de déterminer la dose diagnostique nécessaire pour l'évaluation de la résistance des moustiques sur le terrain.

2. Matériel :

- Tubes d'observation « vert » ;
- Tubes d'exposition « rouge » ;
- Deux (2) bagues métalliques par tube (argentée et dorée) ;
- Tiroirs ;
- Un (1) bouchon avec grille /voile par tube ;
- Un (1) aspirateur à bouche ;
- Fiche de test « test tube ».



3. Préparation du test :

Préparation des tubes de mise en observation “tube vert” :

- Préparer quatre tubes par concentration plus les témoins ;
- Mettre une feuille de papier filtre ou papier d'imprimerie neutre dans les tubes, maintenue par deux bagues argentées ;
- Fermer avec un bouchon l'une des extrémités ;
- Mettre en place le tiroir à l'autre extrémité ;
- Prélever les moustiques directement dans la cage au moyen d'un aspirateur à bouche ;
- Faire des lots de 25 femelles et les glisser délicatement dans les tubes OMS ;
- Fermer le tiroir du tube vert et les mettre pendant 1 heure dans une étuve dont la température est comprise entre 26°C et 28°C et l'humidité relative entre 80 et 100 % ;
- Remplacer si besoin les moustiques morts.



¹ D'après "Série de Rapports Techniques N°443 OMS (17^{ème} rapport GENEVE 1970)".

Préparation des tubes d'exposition "rouges" :

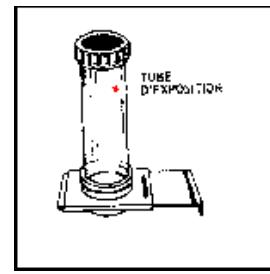
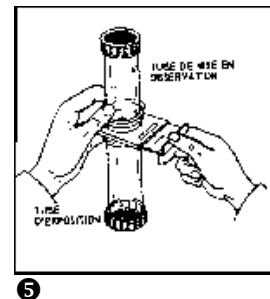
**PREPARER SUR UNE PAILLASSE DESTINEE AUX MANIPULATIONS
D'INSECTICIDE**

Utiliser des gants à usage unique

- Placer les feuilles de papier imprégnées d'insecticide dans les tubes rouges, face imprégnée à l'intérieur (données lisibles à travers le tube),
- Faire tenir le papier avec 2 bagues dorées, puis fermer le tube avec un bouchon.

4. Déroulement du test :

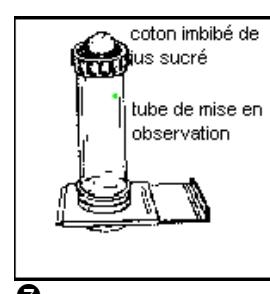
- Préparer la fiche "test en tube" ;
- Visser le tube d'exposition sur le tiroir du tube d'observation ;
- Faire coulisser la plaque de manière à dégager entièrement l'ouverture (photo 5) ;
- Souffler doucement pour faire passer les moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition (photo 5bis) ;
- Fermer le tiroir en repoussant la plaque ;
- Détacher le tube d'observation et le placer derrière le tube d'exposition ;
- Laisser les tubes d'exposition en position verticale, tamis en haut pendant "1 heure" sous un éclairage diffus modéré (photo 6) ;
- Noter si besoin le nombre de moustiques KD à intervalles réguliers ;
- À la fin de la période d'exposition, faire passer les moustiques dans les tubes d'observation de la même manière que précédemment ;
- Conserver les tubes d'observation en position verticale pendant 24 heures dans une étuve, entre 26 et 28 °C et 80 à 100 % d'humidité (photo 7) ;
- Après 24 heures, compter le nombre de moustiques morts et l'effectif total par tube



5bis



6



7

5. Critères d'acceptation :

Pour que le test soit validé la mortalité dans les tubes témoins doit être inférieur à 20 %, si celle-ci est comprise entre 0 et 20 % la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott donnée page 3.

PROTOCOLE TEST EN TUNNEL DE JOUR

1. Principe du test :

Le test en tunnel a pour but d'évaluer l'impact des moustiquaires imprégnées d'insecticides sur des moustiques adultes dans des conditions de laboratoire simulant les conditions du terrain (cases africaines par exemple). Les moustiques sont regroupés dans huit catégories :

1. gorgés - vivants - petit compartiment ;
2. gorgés - vivants - grand compartiment ;
3. gorgés - morts - petit compartiment ;
4. gorgés - morts - grand compartiment ;
5. non gorgés - vivants - petit compartiment ;
6. non gorgés - vivants - grand compartiment ;
7. non gorgés - morts - petit compartiment ;
8. non gorgés - morts - grand compartiment.

Selon qu'ils sont :

1. gorgés ou non-gorgés ;
2. vivants ou morts ;
3. d'un coté ou de l'autre de la moustiquaire imprégnée.

L'analyse détaillée de ces données permet de noter :

- la mortalité due à l'insecticide par détermination des moustiques morts (gorgés ou non gorgés, d'un coté ou de l'autre de la (paroi) moustiquaire) ;
- le degré de protection individuelle (PI) par détermination du nombre de moustiques gorgés (vivants ou morts, d'un coté ou l'autre de la paroi moustiquaire) ;
- le degré de protection collective (PC) par détermination du nombre de moustiques gorgés vivants d'un coté ou de l'autre de la (paroi) moustiquaire.

Dans une moindre mesure, ces huit catégories de moustiques peuvent donner une indication sur le degré minimum d'irritabilité/répulsivité de l'insecticide par détermination du nombre de moustiques récoltés à l'extérieur de la (paroi) moustiquaire.

Le test en tunnel utilisé par le LIN est inspiré du modèle mis au point par Elissa et Curtis². Il a été ensuite adapté par le LIN pour reproduire un peu plus des conditions naturelles puis validé en Côte d'Ivoire en comparant les résultats obtenus en parallèle dans le dispositif en tunnel et les cases expérimentales³.

2. Matériel :

- Un tunnel en verre rectangulaire en verre de 25 cm par 25 cm de section et de 60 cm de longueur ;
- Un cadre en carton plume de 25 cm par 25 cm ;
- Deux armatures métalliques cubiques ;
- Deux tulles moustiquaires tubulaires ;
- Moustiques femelles nullipares âgées de 5 à 7 jours.
- Ventilateur de diamètre 11 cm ref : Ebmpapst 8550N 230V~50Hz70mA 12W zp avec une grille de protection

² Elissa N. and Curtis C.F., 1995. Evaluation of different formulations of deltamethrin in comparison with permethrin for impregnation for netting. *Pesticide Science*, 44: 363-367.

³ Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S., Carneval P. and Guillet P., 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.s. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 81-88.

3. Préparation du test :

Le tunnel est divisé en deux compartiments séparés au deuxième tiers de sa longueur par des rails en aluminium. Une fente sur la partie supérieure du tunnel permet de glisser le cadre en carton plume.

Préparer un cadre en carton plume dont les dimensions extérieures correspondent à celle des rails du tunnel qui recevra ce cadre.

Découper l'intérieur aux dimensions voulues pour la manipulation (généralement 20x20 cm).

Découper le sur-cadre aux mêmes dimensions que le cadre en carton plume. **Photo 1**



Photo 1

Placer le tulle moustiquaire imprégné d'insecticide et percé de 9 trous à tester entre le carton plume et le sur-cadre. **Photo 2** Fixer l'échantillon à tester en l'agrafant avec les deux cadres.

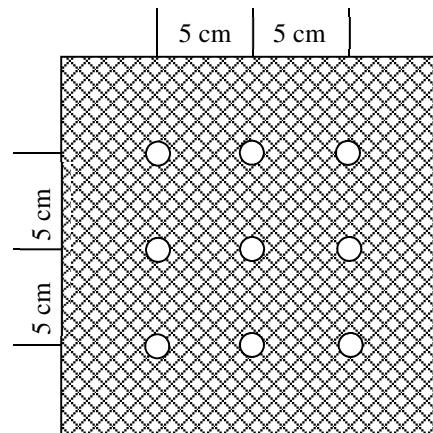


Photo 2

Fermer les bords avec du ruban adhésif afin de leur permettre s'insérer dans les rails.

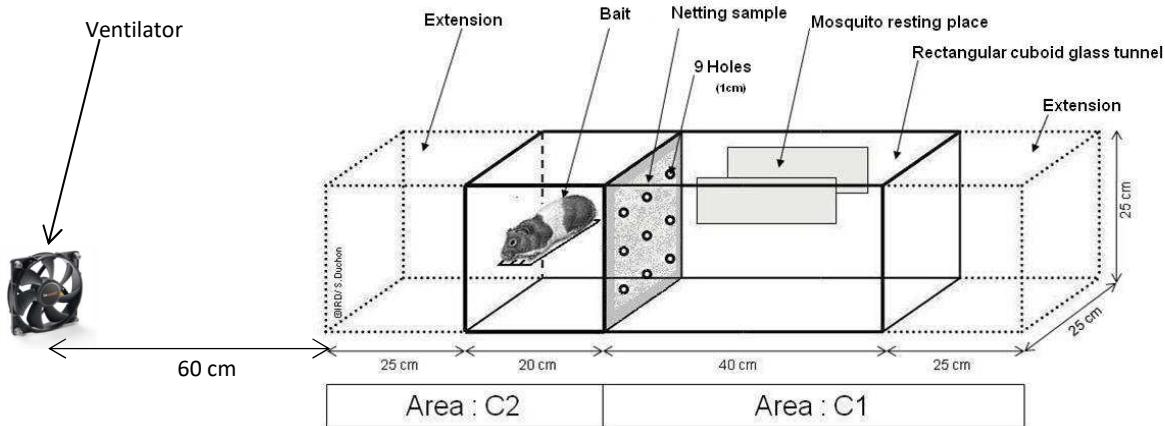
Préparer dans des gobelets fermés par un tulle moustiquaire cent femelles de moustiques âgées de 5 à 7 jours, n'ayant jamais pris de repas de sang par tunnel. Retirer le jus sucré une heure avant la manipulation des moustiques.

Monter les tulles moustiquaires à chaque extrémité du tunnel. Les maintenir en place au moyen d'élastique.

Glisser les armatures métalliques dans les voiles (voir photo ci-dessus).

Mettre en place le cadre en carton plume contenant la moustiquaire dans le tunnel.

Positionner le ventilateur à 1 mètre de la moustiquaire à hauteur du cobaye dans l'axe du tunnel. L'objectif est d'obtenir un flux d'air allant de C2 vers C1 d'une vitesse d'environ 0.125 m/s.



4. Déroulement du test :

Le test se déroulant pendant la journée sur une durée de 8h, le lancement doit donc se faire à partir de 9h00 à 17h.

Disposer le cobaye maintenu en contention dans une cage grillagée dans le petit compartiment.

Introduire les moustiques dans le grand compartiment.

Après une journée (9h00-17h00) passée dans un environnement chaud et humide ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et 80 à 100 % d'humidité), les femelles sont prélevées dans les deux compartiments et classées selon les huit catégories décrites précédemment. Les femelles vivantes seront récupérées dans des gobelets en carton + fond papier wathman par lots de 20 selon les catégories précédemment cité et conservées dans une enceinte climatique jusqu'au lendemain pour une lecture de la mortalité décalée.

Protocole expérimental:

Pour un insecticide et une concentration donnés, on utilise simultanément trois appareils, deux appareils dotés d'une moustiquaire traitée à la concentration préconisée et un appareil doté d'une moustiquaire non traitée (témoin). Les différents paramètres d'évaluation selon les huit catégories énumérées précédemment s'expriment en pourcentage corrigé selon la loi des probabilités indépendantes (formule d'Abbott).

5. Critères d'acceptation :

Pour que le test soit validé, il faut que la mortalité chez les témoins soit inférieure à 10% et leur taux de gorgement supérieur à 50% .(ref guidelines WHO/HTM/NTD/WHOPES/2013.3

PROTOCOLE TEST LARVAIRE

1. Principe du test :

Le test en gobelets a pour but d'évaluer et de suivre le niveau de sensibilité (ou de résistance) de stades larvaires d'une espèce donnée de moustiques à un insecticide. Ce test permet également de comparer l'efficacité de plusieurs insecticides (formulation ou matière active) vis à vis d'une espèce donnée ou encore de comparer la sensibilité de plusieurs espèces de moustiques vis à vis d'un insecticide donné. Dans le cas de bactéries entomopathogènes un titrage biologique permet de comparer les formulations à titrer par rapport à un standard international.⁴.

2. Matériel :

- Gobelets plastique ;
- Pasteurette de 3 ml ;
- Petite passoire ;
- Fiche de test "Fiche test larvaire".

3. Préparation du test :

- Remplir les gobelets avec 99 ml d'eau osmosée ;
- Prélever 20 larves stade fin L3 début L4 avec la pasteurette, les filtrer avec la petite passoire (**Photo 1**) ;
- Déposer 20 larves dans chaque gobelet (**Photo 2**) ;

4. Déroulement du test :

- On réalise à partir d'une solution mère d'insecticide une série de 5 à 6 dilutions La gamme de concentration sera choisie de telle façon qu'on obtienne, au minimum, une mortalité inférieure à 50 % pour deux concentrations, une mortalité supérieure à 50 % pour deux autres concentrations et une concentration létale (100 %) lorsque cela est possible.
- Les concentrations utilisées sont notées sur la fiche de test.
- Une série de 5 gobelets ne contenant que l'eau et 1 ml d'éthanol comme témoin négatif.
- Les gobelets sont ensuite placés dans une étuve pour obtenir des conditions standards de température, entre 26 et 28°C.
- La lecture se fait après 24 heures. Certains insecticides nécessitent une lecture supplémentaire à 48 heures, dans ce cas on ajoute de la nourriture après 24 heures.



Photo 1.



Photo 2.

5. Critères d'acceptation :

⁴ pour *Bacillus thuringiensis* H-14, le standard de référence est l'IPS 82 titrant 15 000 ITU / mg de poudre lyophilisée vis à vis d'*Aedes aegypti* souche Bora Bora. Pour *Bacillus sphaericus*, il s'agit du SPH88, souche 2362 titrant 1 700 ITU / mg sur *Culex pipiens pipiens*, souche Montpellier (Anonyme, 1999. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use).

Pour que le test soit validé la mortalité dans les gobelets témoins doit être inférieur à 20 %, si la mortalité est comprise entre 0 et 20 % la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott donnée page 3. De plus il faut obligatoirement obtenir quatre points exploitables pour l'analyse de la relation dose/effet (logiciel log/probit Analisys) pour que le test soit retenu.

TEST EN CÔNE

1. Principe du test :

Le test en cône a pour but d'évaluer au laboratoire sur des moustiques adultes l'efficacité et la rémanence d'un insecticide sur un substrat donné : tissu, tulle moustiquaire, terre, bois, etc. C'est également un outil approprié pour tester la résistance au lavage de formulations insecticides sur différents types de substrats en tissu. Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un pyréthrinoïde, en terme de mortalité et d'effet Knock Down (effet KD). Cette évaluation simultanée du KD et de la mortalité permet ainsi d'apprécier la bio-disponibilité de l'insecticide sur le substrat.

Les cônes standardisés par l'OMS sont en PVC, une matière sur laquelle les moustiques ont des difficultés à se poser, ce qui favorise le contact entre les moustiques et le substrat. Ce dispositif permet ainsi de s'assurer que les tarses du moustique sont bien en contact avec le support traité tout au long de l'exposition.

2. Matériel :

- Cônes en PVC de l'OMS ;
- Deux plaques de plexiglas transparent 24 x 27 cm percées de quatre trous de 95 mm de diamètre pour tester des moustiquaires ou des tissus ;
- Des boîtes de pétri carré de 12 x 12 cm contenant de la terre, du plâtre, du ciment ou du bois pour tester ces substrats ;
- Un aspirateur à bouche ;
- Fiche de test « cône ».

3. Préparation du test :

Test sur moustiquaires ou tissus imprégnés :

- Préparer en premier le support témoin, puis les supports recevant les échantillons traités.
- Placer la moustiquaire ou le tissu d'une surface de 0,0625 m² (soit 0,25m x 0,25m) entre les deux plaques de Plexiglas transparent comportant quatre trous à l'emplacement exact où doivent se trouver les cônes.
- Maintenir bloqué l'ensemble avec des pinces "double clips".
- Placer les supports en oblique à 40° sur un support grillagé métallique ou un support en bois recouvert de papier blanc.
- Fermer avec un bouchon en polyéthylène l'orifice supérieur des cônes (ouverture sur l'extérieur) **Photo 1.**

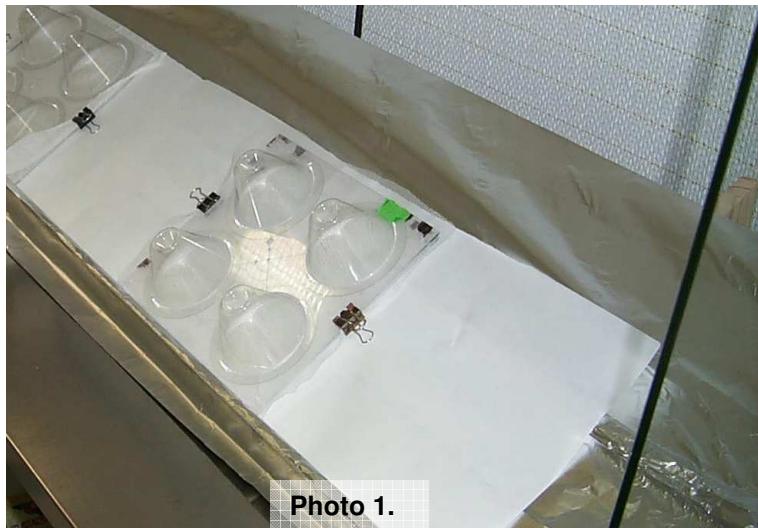




Photo 2

Test sur substrat :

- Les substrats solides (boue, plâtre, ciment) sont coulés dans une boîte de Pétri carré de 12 x 12 cm.
- Le cône est maintenu en place avec le couvercle de la boîte dans lequel est percé un trou du diamètre du cône (90 mm) et deux élastiques.
- Dans le cas de support en bois, le cône est fixé sur celui-ci par un ruban adhésif. (Photo 2.).

Dans tous les cas préparer des gobelets en plastique de 200 ml fermés par un morceau de moustiquaire troué servant à recevoir les moustiques après le test pour observation pendant 24 heures.

4. Déroulement du test :

Tous les renseignements sont notés sur la fiche de test "Test en cône". Le temps d'exposition des moustiques (à jeun et âgés de 2 à 5 jours, généralement des femelles) est, selon les supports, de 3 mn (moustiquaire) avec 5 individus ou de 30 mn (support plein) à raison de 15 individus par cône. Pendant toute la durée de l'exposition, les cônes sont maintenus à 25°C sous une lumière tamisée. À la fin du temps d'exposition, les moustiques sont transférés dans un gobelet pourvu de coton imbiber de miel.

Si besoin le taux de KD est noté à intervalles réguliers post exposition ou après 30 et 60 minutes selon le protocole du projet.

Les moustiques sont ensuite placés en observation dans l'obscurité pendant 24 heures dans une étuve maintenue entre 26 et 28°C et 80% à 100% d'humidité.

Après ce délai le nombre d'individus morts est compté.

Les moustiques capables de voler sont considérés comme vivants. Il est cependant fréquemment observé avec les pyréthrinoïdes que les moustiques survivants sont capables de voler même avec plusieurs pattes manquantes, parfois jusqu'à 5. Ce phénomène d'auto-section des pattes survient autant au laboratoire que dans la nature. Les moustiques ayant moins de trois pattes ne survivent pas dans les conditions naturelles. Une "mortalité fonctionnelle" (morts + vivants avec moins de 3 pattes ou) sera défini par opposition à une mortalité réelle. Cette distinction n'a pas forcément lieu d'être détaillée. On parle en général de mortalité.

5. Critères d'acceptation

En plus du témoin négatif (support non imprégné) un témoin positif est utilisé pour les tests sur les souches sensibles sur moustiquaire. Celui-ci est composé d'un tulle imprégné de deltaméthrine à 25 mg/m² donnant 95 à 100% de mortalité.

Pour que le test soit validé il faut que la mortalité chez les témoins négatifs soit inférieure à 10%. Lorsque celle-ci est comprise entre 0 et 10 % la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott donnée page 3. La mortalité dans les témoins positifs doit être comprise entre 95 et 100%. De plus il faut obligatoirement obtenir quatre points exploitables pour l'analyse de la relation dose/effet (logiciel log/probit Analisys) pour que le test soit retenu.

APPLICATION TOPIQUE

1. Principe du test :

Les applications topiques sont des tests qui visent à mettre en contact forcé l'insecte avec l'insecticide pour permettre de déterminer la relation dose-mortalité d'un insecticide sur des moustiques adultes. Il est pratiqué communément chez des insectes de grande taille (glossines, punaises, etc.) et a été adapté par le LIN pour être utilisé sur des moustiques adultes.

Ce test fournit une mesure précise de l'activité par contact d'un insecticide, en dehors de tout autre effet lié au comportement de l'insecte face à l'agression insecticide. Ce phénomène est particulièrement vrai dans le cas des pyréthrinoïdes qui ont un effet irritant et répulsif.

Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures d'observation. Les résultats sont corrigés selon la loi des probabilités indépendantes (formule dite d'Abbott). L'analyse Log-Probit des données permet d'établir une droite de régression et de calculer les DL 50 et 95.

La matière active d'insecticide est dissoute dans de l'acétone, un solvant organique très volatil qui ne reste pas longtemps en contact avec la cuticule de l'insecte. Les concentrations d'insecticides s'expriment en nanogramme de matière active par mg de moustiques (ng/mg de moustique), ce qui impose au préalable la pesée des moustiques testés, le poids moyen est réalisé à partir d'une pesée de 50 moustiques.

2. Matériel :

- Une plaque réfrigérée ;
- Deux bacs en plastique ;
- Des pipettes pasteur en verre préparées avec un micro-capillaire ;
- Plume fine d'oiseau montée sur manche en plastique ; ou un pinceau fin (poil de sanglier)
- Petite coupelle de pesée ;
- Moustiques femelles à jeun, âgées de 3 à 5 jours ;
- Fiche de test « application topique ».



3. Préparation du test :

- Coller une feuille de papier sur le fond intérieur du bac plastique 1 ;
- Dans le bac plastique 2 mettre de la glace pilée sur les ¾ de la hauteur (s'il n'y a pas de machine à glace préparer la veille de l'eau dans le bac et le stocker à -20°C), tasser la glace ;
- Ajouter de l'eau sur 5 mm ;
- Mettre le bac 1 sur la glace ;
- Aspirer des moustiques dans une cage "roubeau" ;
- Anesthésier les moustiques au CO₂ (20 à 40 secondes de jet, 30 secondes en attente) dans une boîte plastique hermétique ;
- Repartir les moustiques endormis sur le fond du bac ;
- Séparer les mâles des femelles, faire des lots de 25 femelles.

Le micro-capillaire calibré de 0,1 μ l permet de déposer une micro-goutte d'insecticide sur la face dorsale du pronotum de femelles de moustiques pris isolément et maintenus en léthargie grâce à une table réfrigérante maintenue à environ 4°C.



© IRD/N. Baudoin

4. Déroulement du test :

IMPORTANT : toujours commencer par les témoins, puis continuer avec l'insecticide en dose croissante.

Déposer une série de 25 moustiques sur la table réfrigérante.

À l'aide du micro-capillaire, déposer 0,1 μ l d'insecticide sur le dessus du thorax du moustique (pronotum).

Répéter l'opération pour les 25 moustiques. Transférer ceux-ci dans un gobelet plastique de 200 ml recouvert d'un tulle moustiquaire sur lequel est déposé un coton imbibé de jus sucré.

Recommencer ces opérations autant de fois que nécessaire pour avoir le nombre de moustique voulu pour chaque concentration d'insecticide.



Peser 50 moustiques pour obtenir le poids moyen d'un moustique.

À la fin du test placer les gobelets en observation pendant 24 heures dans une étuve dont la température est maintenue entre 26 et 28°C et l'humidité relative est comprise entre 80 et 100%.

Après ce temps, les moustiques morts sont décomptés.



5. Critères d'acceptation :

Pour que le test soit validé la mortalité chez les témoins doit être inférieur à 20 %, si la mortalité est comprise entre 0 et 20 % la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott donnée page 3. De plus il faut obligatoirement obtenir quatre points exploitables pour l'analyse de la relation dose/effet pour que le test soit retenu.

TEST D'IRRITABILITE

1. Principe du test :

Le test d'irritabilité a pour but d'étudier le comportement d'un moustique vis à vis d'un insecticide à effet irritant (en général un pyréthrinoïde). Les tests d'irritabilité sont généralement effectués avec du papier Whatman pour éviter une pénétration trop importante de la matière active dans le substrat.

2. Matériel :

- Cônes standards en PVC fournis par l'OMS ;
- Papier Whatman imprégné avec l'insecticide à tester (voir référence sur la fiche instruction "Préparation des papiers imprégnés" page 8) ;
- Moustiques femelles à jeun, âgées de 3 à 5 jours.

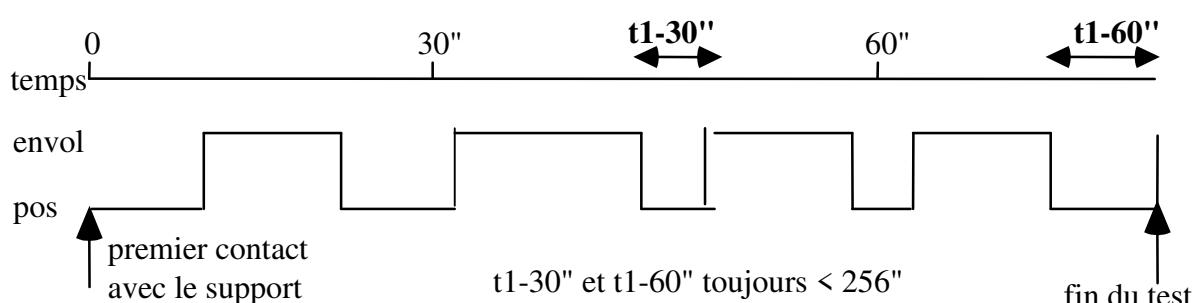
3. Déroulement du test :

Le calcul des temps d'envol se fait au moyen d'un programme informatique sous Excel conçu par le LIN. Lancer celui-ci.

Introduire un moustique dans le cône posé sur le papier imprégné d'insecticide. La concentration retenue pour l'imprégnation correspond à deux fois la valeur de la dose diagnostique (dose opérationnelle) déterminée par les tests en tube.

Suivre les indications données par le programme.

Lorsque le programme indique la fin du test ôter le moustique et recommencer jusqu'à l'obtention du nombre de moustiques voulus.



PROTOCOLE TEST D'INHIBITION DU REPAS SANGUIN

Marie Rossignol 2019

1. Principe du test :

Ce test permet de déterminer l'efficacité répulsive de matériaux sur appâts vivants (le modèle animal sera utilisé). On notera le nombre de moustiques gorgés à l'issue d'un temps d'exposition. On pourra alors déterminer l'efficacité répulsive de l'échantillon en déterminant le taux de gorgement, nombre de femelle gorgé par rapport aux nombre de femelles exposées et en calculant le taux d'inhibition du repas de sang par rapport au témoin non traité.

2. Matériel :

- Pièce L04
- Une armature de cage cylindrique métallique.
- Une tulle de moustiquaire tubulaire ;
- Femelles nullipares âgées de 5 à 10 jours.
- Cage de contention de lapin
- Lapin « insecticide »
- Scotch papier (ou scotch de peintre)

3. Méthode: Utilisation de matériaux imprégnés (moustiquaire) :

Le matériel à tester doit être en maille permettant une piqûre du moustique au travers de l'échantillon:

- de format tubulaire diamètre 10 cm et/ou extensible, il sera glissé sur l'armature circulaire
- de format plat , l'expérimentateur fera un montage pour le maintenir sur l'armature circulaire sera recouvert par une tulle moustiquaire non traité identique au témoin négatif.

Mettre le lapin en contention selon la procédure de contention (cf manuel d'élevage)

50 femelles nullipares, âgés de 5-10 jours sont introduites dans cette cage.

Positionner la cage sur les oreilles du lapin.

Maintenir la cage en position avec du scotch papier.

Le temps d'exposition est de 30 minutes dans un environnement calme à 27°C +/- 2°C.

À l'issue des 30 minutes d'exposition, on décomptera les femelles gorgées ou non. Les résultats seront corrigés par le témoin et on exprimera ces résultats en termes de réduction du taux de piqûre.

4. Critères d'acceptation :

Le premier lot de moustiques sera exposé sans traitement. Pour que le test soit validé il faut que le nombre de femelles gorgées chez le témoin soit égal ou supérieur à 70 %.

PROTOCOLE TEST EN CHAMBRE CIRCULAIRE⁵

Julien BONNET septembre 2008

1. Principe du test :

Le test en chambre circulaire a pour but de mesurer au laboratoire le temps médian d'effet knock-down d'un substrat traité d'insecticide sur des moustiques adultes : tulle moustiquaire, tissu, ciment... Le temps médian d'effet knock-down (noté MKDT pour median knock-down time) est le temps au bout duquel, par contact forcé avec le substrat, 50% des moustiques sont KD. Ce test permet de suivre précisément par un test biologique l'évolution de la concentration en insecticide à la surface d'un substrat. Cette concentration représente celle réellement disponible vis-à-vis du moustique (contrairement à la concentration totale en insecticide du substrat déterminée par chromatographie). Ainsi ce test peut être utilisé pour suivre la dynamique de régénération d'une moustiquaire après lavage, résultat de la migration de l'insecticide de l'intérieur des fibres vers la surface.

Le temps médian d'effet knock-down est nettement dépendant de la formulation insecticide utilisée pour l'imprégnation et de la nature du substrat. Pour cette raison, il est difficile de comparer les temps obtenus avec un même insecticide d'un produit à l'autre.

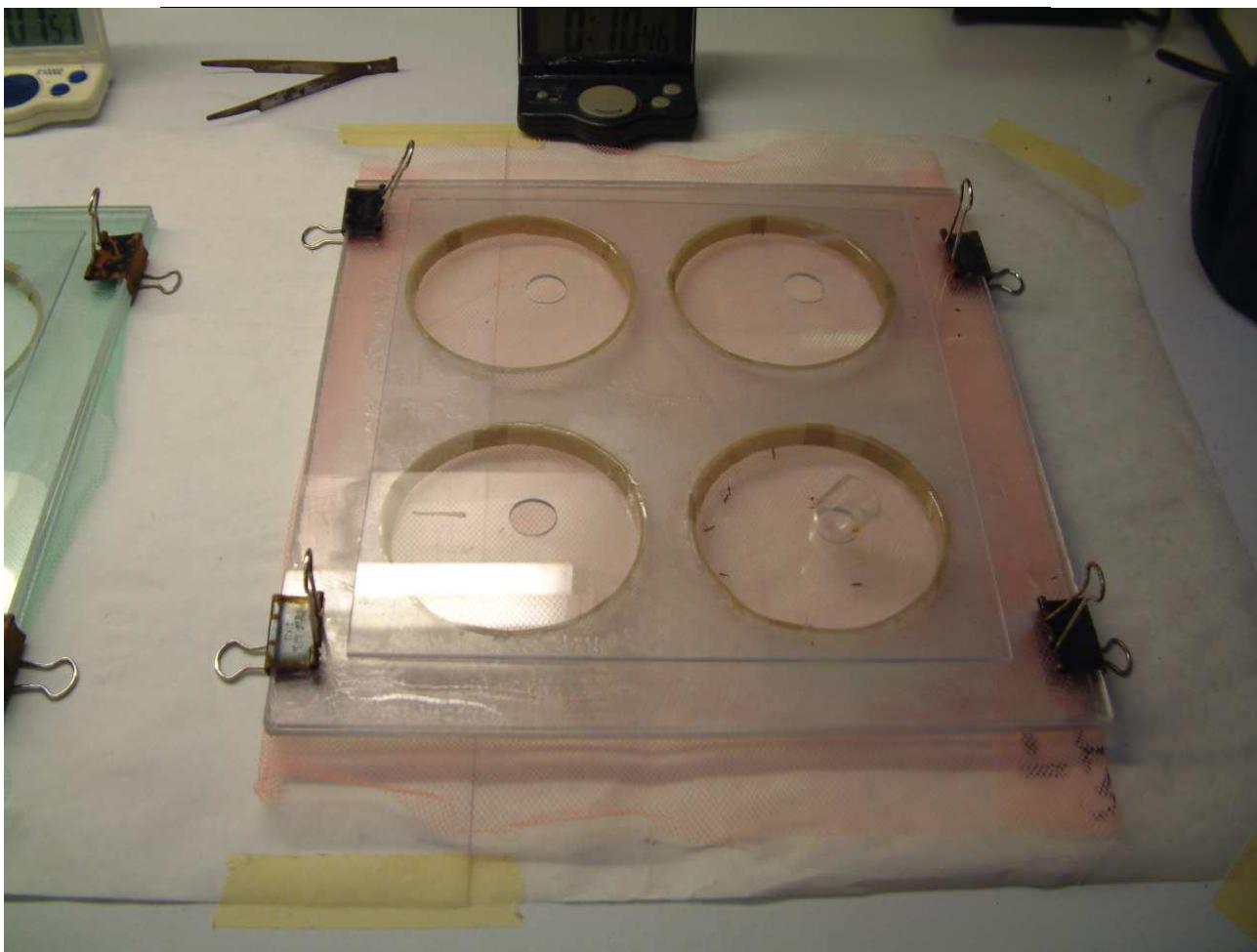
2. Matériel :

- Une plaque de plexiglas transparent de 30 × 30 cm épaisse de 1 cm et percée de 4 trous de 10 cm de diamètre, constituant chacun une chambre circulaire.
- Une plaque fine de plexiglas transparent de 30 × 30 cm maintenue sous la plaque précédente à l'aide de pinces « double clips ».
- Une plaque fine de plexiglas transparent de 25 × 25 cm amovible percée de 4 petits trous destinés à introduire les moustiques, fermés à l'aide de bouchons en polyéthylène.
- Un ou plusieurs chronomètre(s).
- Un aspirateur à bouche.
- Une feuille de papier pour noter les résultats.

3. Préparation du test :

- Placer la moustiquaire ou le tissu à tester d'une taille de 30 × 30 cm environ entre la plaque de plexiglas épaisse et la plaque fine aux mêmes dimensions. Maintenir l'ensemble bloqué à l'aide de pinces « double clips ».
- Installer le support verticalement, bien l'éclairer pour faciliter l'observation.
- Placer la plaque fine amovible, percée d'un trou (permettant d'introduire les moustiques) sur l'ensemble. Faire coulisser cette plaque pour fermer totalement la chambre.
- Maintenir le dispositif à une température de 25°C pendant la durée du test.

⁵ Ce test n'est plus utilisé au laboratoire mais conservé dans le manuel pour information.



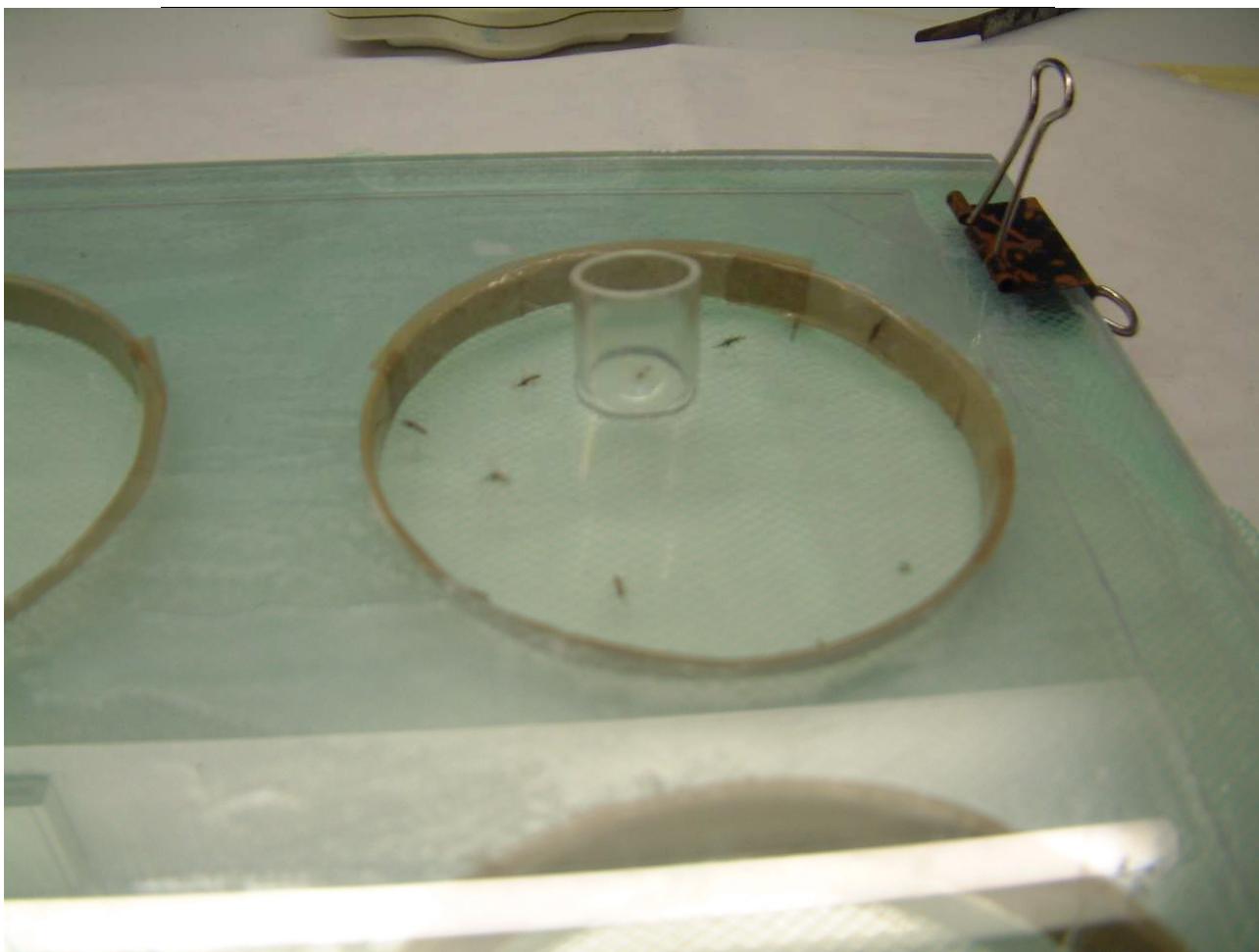
4. Déroulement du test :

Introduire 13 moustiques femelles (nullipares et âgés de 2 à 5 jours) dans une des quatre chambres disponibles et déclencher le chronomètre. Fermer l'orifice de la chambre en faisant coulisser la plaque.

Contrôlez à intervalle régulier l'état des moustiques à travers la plaque de plexiglas et notez le nombre d'individus KD. Un moustique sera considéré comme KD lorsqu'il sera incapable de voler pendant un temps significatif (en dehors de vols brefs) et qu'il présentera des signes d'irritation évidents (pattes parcourues de spasmes). Au-delà de cette période, le moustique deviendra totalement incapable de voler et se couchera sur le dos ou le flanc. Ces critères d'observation demeurent soumis à l'appréciation du testeur.

Lorsque le nombre d'individus KD atteindra la moitié de l'effectif testé (7 individus pour un échantillon de 13 moustiques), le temps écoulé *en secondes* au contact du substrat sera noté comme MKDT. Il est conseillé de réaliser plusieurs répliques (habituellement 3 répliques) du test sur le même échantillon, en utilisant les trois autres chambres disponibles. Les données obtenues seront ensuite compilées pour obtenir une valeur de MKDT représentative de l'échantillon.

N.B. : il est possible de réaliser le test avec un effectif de moustiques différent de 11 ou 15 individus; le temps sera alors relevé lorsque 6 ou 8 moustiques, respectivement, seront notés KD.



5. Critères d'acceptabilité :

Un substrat non traité identique au substrat testé pourra être utilisé comme témoin négatif. Le test sera validé si l'effet KD observé au bout d'un temps de contact d'une heure avec ce témoin est inférieur à 10 %.

Un substrat identique au substrat testé, traité à la deltaméthrine 25 mg/m², pourra être utilisé comme témoin positif. Le test sera validé si l'effet KD observé au bout d'un temps de contact de 15 minutes avec ce témoin est égal à 100%.

6. Interprétation :

Dans le cadre de l'évaluation d'une moustiquaire à longue durée d'action (LN), le test en chambre circulaire pourra être utilisé pour suivre la dynamique de régénération après lavage. Le temps de régénération de la moustiquaire sera égal au nombre de jours nécessaires pour que la valeur du MKDT atteigne un plateau (à un niveau généralement différent du niveau observé avant lavage).

TEST DE RESISTANCE AU LAVAGE

1. Principe du test :

Les tests de résistance au lavage ont pour but de mesurer la bio disponibilité d'un insecticide après plusieurs lavages consécutifs dans des conditions standardisées proches des conditions observées en milieu tropical.

Des standards ISO sont disponibles pour les procédures de lavage en machine. Ils ne sont cependant pas représentatifs du lavage à la main comme pratiqué dans les pays en développement, notamment en Afrique. Plus couramment, les moustiquaires sont lavées à la main avec un savon de base type savon de Marseille dans de l'eau à la température de 25/30°C. Dans le but d'être plus proche des conditions de terrain, nous avons standardisé notre propre procédé de lavage (toujours la même eau, le même volume, même qualité, même température, même surface de tissu, même savon et quantité de savon, même temps d'agitation et de rinçage, etc.).

2. Matériel :

- Un bain-marie agitateur ;
- Flacons de laboratoire de 1 litre type « Schott Duran ».

3. Déroulement du test :

Un échantillon de 25 x 25 cm de moustiquaire imprégnée est immergé dans 500 ml d'eau osmosée à 2 gr/l de savon de Marseille (préalablement dissout avec un agitateur magnétique). Chaque bouteille contenant le savon est placé dans un bain-marie à 30°C sur un chariot agitateur avec un mouvement d'aller / retour de 155 mvt/s par minutes pendant 10 minutes. Les moustiquaires sont rincées deux fois successivement pendant 10 minutes avec la même vitesse d'agitation. Les échantillons sont lavés et testés plusieurs fois selon le protocole du projet..



Suivi fécondité / fertilité

1. Principe du test

Le suivi de fécondité fertilité a pour but de regarder l'effet d'un insecticide sur le déroulement de la ponte (fécondité) et sur l'éclosion des œufs pondus (fertilité). L'effet de l'insecticide sur la ponte ou l'éclosion sera comparé à des témoins. Ce test permet de déterminer :

1. La mortalité des femelles gorgées de sang dans des cages au bout de 4 jours
2. Taux de gorgement
3. Inhibition du repas de sang des femelles traitées par rapport au contrôle
4. Le nombre de femelles gorgées en vie à 24 H
5. Le nombre d'œufs par femelle gorgées en vie à 24 H.
6. Le nombre de larves par 100 œufs.
7. Réduction de la fécondité (nombre d'œufs par femelle traitées gorgées en vie à 24 H par rapport aux témoins)
8. Réduction de la fertilité (nombre de larves pour 100 œufs dans les traitées par rapport aux témoins)
9. Réduction de la descendance (nombre de larves par femelle traitées gorgées en vie à 24h par rapport au témoin).
10. Réduction globale de la descendance (nombre de larves obtenues par femelle traités par rapport aux témoins).

2 Matériels

Système de gorgement (cage de contention, lapin ou membrane)

Gobelet carton grand format 450ml,

Disque circulaire de papier filtre (wathman Ø 90mm cat n° 114 090) coton

DM12 solo

Tetramine

Femelles nullipares de 5 à 10 jours préalablement testées.

Software : egg counter (Mollahosseini et al. 2012)

3 Déroulement du test.

Préparation des gobelets

Dans un gobelet en carton : mettre un fond de coton (1cm) recouvrir d'un papier filtre wathman circulaire puis voiler le gobelet avec une moustiquaire pourvu d'un orifice obturé avec un coton.

Préparer le nombre de gobelet nécessaire en fonction du nombre de moustique testés. Les moustiques sont récoltés par 5 ou par 10 dans les gobelets en fonction du nombre total de moustiques testés et de la place disponible pour les conserver.

Gorgement des femelles ou récupération des femelles gorgées post test insecticide :

En fonction du type de test insecticide pratiqué les moustiques peuvent être gorgé directement dans l'appareil de test (test en tunnel) ou transférer dans une cage pour gorgement sur lapin en contention puis transféré dans les gobelets cartons.

Test en tunnel

A la fin du test en tunnel les moustiques gorgés sont récoltés avec un aspirateur à bouche et mis par 5 ou par 10 dans les gobelets cartons en identifiant le gobelet par le nom de la moustiquaire et la chambre de récupération de laquelle les moustiques ont été récolté.

Autres tests :

A la fin du test après la dernière observation,

Compter la mortalité

Transférer les moustiques dans une cage (une cage par condition et par réplique)

Mettre le lapin en contention dans sa cage

Placer la cage sur les oreilles du lapin et laisser les moustiques se gorger pendant 30 à 60mn.

Retirer la cage

Récupérer délicatement les femelles gorgées et les placer par lot de 5 à 10 femelles dans les gobelets pondoir identifiés par traitement et numéro.

Il est recommandé d'attendre une heure entre le gorgement et le transfert en gobelet. Attention chaque manipulation fragilise le moustique en particulier les femelles gorgée sont fragiles. Seules **les femelles vivantes gorgées** sont transférée dans les gobelets cartons.

Les femelles non gorgées sont :

- soit maintenu dans la cage avec accès à un coton imbibé de jus sucré dans un étuve à $2^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$ et $80\%\pm10\%$ d'humidité pour une lecture de mortalité à 24h post traitement.
- Soit les femelles sont tuées et comptabilisées.

Le coton du fond de gobelet est imbibé d'eau osmosée avec une seringue en soulevant légèrement le papier filtre avec environ 15 à 20 ml d'eau osmosée.

Les femelles gorgées et non gorgées sont comptabilisées pour établir le taux de gorgement.

Le contrôle doit avoir un taux de gorgement de 70% pour la validité du test.

Les femelles gorgées sont mises à l'étuve avec accès à un coton imbibé de jus sucré (miel 10%). La mortalité est suivie quotidiennement jusqu'à 4 jours et le jus sucré est changé tous les jours.

Ponte :

A 96h après le gorgement les œufs sont récoltés :

Aspirer les femelles vivantes, éliminer les cadavres.

A l'aide d'une pince, sortir délicatement le disque whatman sur lequel sont les œufs et faire une photo.

Dénombrer les œufs



Mise en eau des œufs

La ponte de chaque gobelet carton est mis en eau dans un pot solo DM12 identifié comme le gobelet et nourris légèrement avec du tétramine.

Pour les contrôles, seulement une centaine d'œufs de trois gobelets tirés au sort sont mis en eau.

A 72h les larves sont dénombrées puis éliminés.

Caractérisation moléculaire de la résistance aux insecticides.

Protocoles des Essais Biochimiques, pour les moustiques.

1. Principes

Il s'agit ici de doser les activités ou composants de différentes familles d'enzymes qui sont reconnues pour intervenir dans la résistance métabolique aux insecticides.

Les expérimentations se déroulent sur la semaine. Les courbes étalons ne sont pas présentes sur chaque plaque testée mais sont réalisées au début de la série de plaques le jour 2. Elles seront rappelées ensuite pour chaque plaque passée.

Si la plaque de test n'est pas pleine, on peut toujours ajouter 2 points de gamme pour contrôle interne.

Jour 1 : préparation des différentes solutions tampons et gammes.

Jour 2 : Etablissement des gammes étalons, les gammes sont réalisées en tripliquette. Les gammes sont valables pour une série d'expériences qui se déroulent la même quinzaine.

Sinon refaire la gamme si les manips se déroulent sur le mois.

Jour 3 et plus : préparation des échantillons : broyage échantillons en eau sur glace ou au Fast prep en carboglace, mise en plaque puis tests biochimiques.

1. Oxydases
2. Estérases a et b
3. Dosage de protéines totales
4. GST
5. Acétylcholinestérase

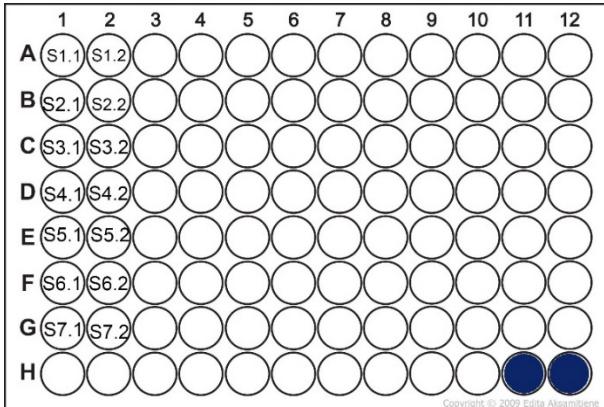
2. Matériel

- Spectrophotomètre pour microplaques permettant la lecture en cinétique, équipé des filtres
340 (UV), 420, 550, 595, 630 nm
- centrifugeuse réfrigérée
- tubes pour le Fastprep à colerette bouchon vissant, et tubes eppendorf 1.5 ml , billes acier 2 mm.
- microplaques 96 trous fond plat microtitration **Greiner**.
- Pipette multicanaux, réservoirs de réactif, cônes, tubes de 0.5 ml, piston ou billes pour broyage.
- Fast prep, carboglace

3. Préparation des Moustiques (jour 3 et plus)

Les enzymes se dégradant rapidement à température ambiante, il est **indispensable de toujours travailler sur la glace.**

- **Mettre la centrifugeuse à refroidir à 4°C, préparer de l'eau rafraîchie (4°C) dans tubes.**
220 µl h2O rafraîchie pour les anophèles ou 300 µl pour les Aedes.
- Repartir un moustique de 2-5 jours/ tube (2 ml bouchon vissant ref Sarstedt 72694) garder sur glace. Si la collecte a lieu en amont du test alors conserver les échantillons à -80°C à sec.
- Installer le rotor à carboglace (rotor bleu) dans le Fastprep, charger de carboglace.
- Effectuer un cycle de 10 sec pour « vaporiser » la carboglace dans le rotor.
- Placer les tubes et on tourne 30 sec 4m/s.
- Laisser décanter 3 min sur glace puis
- Récupérer 2*25µl du broyat à répartir directement sur la plaque Ache réserver à 4°C.
 - Transférer le reste du surnageant dans un tube eppendorf si on est en tube Sarstedt ou passer directement à l'étape suivante si on est déjà en eppendorf.
 - Centrifuger le reste du broyat à 14,000 rpm pendant 60 sec 4°C.
 - Transférer le surnageant dans une microplaqué en remplissant une colonne sur deux.
 - Pour les Aedes réaliser une microplaqué diluée au demi à partir de 50µl d'extrait de moustique destiné au dosage des protéines totales.
 - Répartir dans des microplaques, à raison de deux répliques par moustique dans deux puits contigus les extraits enzymatiques. La quantité de surnageant prélevée est en fonction du système enzymatique à doser : 20 µl pour le dosage des monooxygénases à cytochrome P450, 20 µl pour les dosages des protéines totales, 10µl des estérases non spécifiques, 20µl des glutathion S-transférases.
 - Sur toutes les microplaques, remplir les deux derniers puits contigus d'eau distillée pour le bruit de fond. Ainsi, une microplaqué de 96 puits permet l'analyse de 47 moustiques en deux répliques.



Préparer tout de suite les plaques pour les différents essais :

| | |
|--------------------|-----------|
| Oxydases | 20µl *2 |
| Esterase alpha | 10µl *2 |
| Esterase beta | 10µl *2 |
| GST | 10 µl *2 |
| Protéines totales* | 20 µl * 2 |

Les puits G12 et H12 sont réservés au blanc (eau).

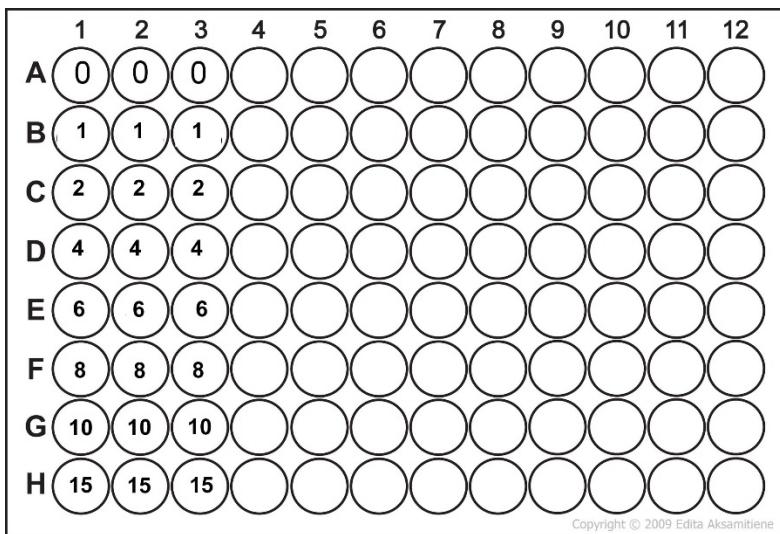
Conserver les plaques avec couvercle à 4°C ou sur glace.

*pour la mesure des protéines totales chez les Aedes déposer 20µl de l'extrait dilué au demi.

4. Préparation des gammes étalons (jour 2)

✓ ***Courbe étalon protéines totales.***

Selon la méthode de Bradford avec le kit Coomassie plus protein Assay (Thermofisher). La solution mère de Bovine Serum Albumine (BSA) à 2mg/ml est fournie. La BSA peut être pesée aussi et resuspendue en eau stérile.



- Préparer une série de dilutions à partir de la solution stock BSA :

| | |
|--------------|---|
| 0.75 mg/ml = | 225µl BSA + 375µl H ₂ O |
| 0.50 mg/ml = | 250 µl BSA + 750 µl H ₂ O |
| 0.4 mg/ml = | 200 µl BSA + 800 µl H ₂ O |
| 0.3 mg/ml = | 90 µl + 510 µl H ₂ O |
| 0.2 mg/ml = | 100 µl + 900 µl H ₂ O |
| 0.1 mg/ml = | 500 µl à 0.2mg/ml +500 µl H ₂ O |
| 0.05 mg/ml = | 100 µl à 0.5mg/ml + 900 µl H ₂ O |
| Background = | H ₂ O seulement |

- Déposer 20 µl en triplicat de gamme du moins concentré vers le plus concentré.
- Ajouter 130 µl d'eau
- Ajouter 150 µL du réactif Bradford (même volume que eau+gamme ou Echantillon)
- Agiter 30 secondes dans le lecteur de plaque (SPARK), puis
- incuber 5 minutes à température ambiante
- Lire en point final à 595 nm

Interprétation

En suivant ce protocole, la quantité de protéines dans les puits (20µl) sera de:

| | |
|----------|------|
| 0.015 mg | 15µg |
| 0.010 mg | 10µg |
| 0.008 mg | 8µg |
| 0.006 mg | 6µg |

| | |
|--------------------|-----------|
| 0.004 mg | 4 μ g |
| 0.002 mg | 2 μ g |
| 0.001 mg protéines | 1 μ g |

La courbe étalon doit s'ajuster à une droite : $DO = ax+b$ où x est la quantité de protéines dans le puits. Demander l'affichage de la droite et de l'équation puis calculer les x Magellan (software du Nanoquant) le fait, sinon entrer la formule dans excell.

Ne pas oublier de sauvegarder les données de la courbe étalon et la droite elle-même. En utilisant cette formule avec les DO des échantillons il est possible de déterminer la quantité de protéines (en mg) dans 20 μ l de broyat de puces.

Pour les échantillons, reprendre la procédure au point a. Remplacer la gamme par les échantillons à déposer en dupliCat.

Courbe étalon des Estérases

Deux types d'esterases à doser α et β donc 2 gammes étalon à faire

Gammes étalon :

- Préparer une solution mère (SM) d'alpha-Naphtol (MW=144.2g) 100mM dans l'éthanol et une autre de beta naphtol: 14.42 mg pour 1 ml d'éthanol.

- Préparer des dilutions intermédiaires pour chaque étalon

S10 : 10 mM = 150 μ l SM + 1350 μ l H₂O dans un tube de 2 ml

S1 : 1 mM = 200 μ l S10 + 1800 μ l H₂O dans un tube de 2 ml

- Préparer une série de dilutions pour chaque étalon :

| | 1 α estérase | 2 | 3 | 4 | 5 β estérase | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------------|------|------|---|--------------------|------|------|---|---|----|----|----|
| A | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| B | 0.2 | 0.2 | 0.2 | | 0.2 | 0.2 | 0.2 | | | | | |
| C | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | | | | |
| D | 0.8 | 0.8 | 0.8 | | 0.8 | 0.8 | 0.8 | | | | | |
| E | 1.2 | 1.2 | 1.2 | | 1.2 | 1.2 | 1.2 | | | | | |
| F | 1.6 | 1.6 | 1.6 | | 1.6 | 1.6 | 1.6 | | | | | |
| G | 2 | 2 | 2 | | 2 | 2 | 2 | | | | | |
| H | 4 | 4 | 4 | | 4 | 4 | 4 | | | | | |

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

4 mM = 400 μ l S10 + 600 μ l H₂O

2 mM = 200 μ l S10 + 800 μ l H₂O

1.6 mM = 160 μ l S10 + 840 μ l H₂O

1.2 mM = 120 μ l S10 + 880 μ l H₂O

0.8 mM = 800 μ l S1 + 200 μ l H₂O

0.4 mM = 400 μ l S1 + 600 μ l H₂O

0.2 mM = 200 μ l S1 + 800 μ l H₂O

Background = H₂O

seulement

- Avant de commencer,

préparer :

- Les solutions d'alpha naphtyl acetate et B naphtyl acetate : 3 ml PBS pH 6.5 triton 1%

8.4 ml dH₂O

600 μ l alpha ou beta naphtyl acetate 0.06 M (3mM final)

- La solution de révélation Fast Garnet :

préparer pendant le point e.

0.01g Fast garnet salt(FGBC)

12 ml dH₂O , bien vortexer, garder au noir

- 10 μ l de gamme /puit en triplicat du Background jusqu'à 4 mM
- Ajouter 90 μ l PBS pH 6.5 1% Triton/puit
- 100 μ l de solution d'alpha-Naphthyl acétate ou béta-Naphthyl acétate.
- Ajouter immédiatement 100 μ l de solution FGBC
- Incuber 10 minutes à RT avec un couvercle
- Lire en point final à 550 nm

Pour les échantillons :

- 10 µl de broyat en deux répliques
- 90 µl PBS pH 6.5 triton 1% /puit
- **Incuber 10 minutes à RT**
- 100 µl de solution: d'alpha-Naphthyl acétate (ou béta-Naphthyl acétate)en PBS triton1%
- **Incuber 30 minutes à RT**
- Ajouter 100 µl de solution FGBC
- Incuber la plaque 10 minutes à RT avec un couvercle
- Lire en point final à 550 nm

Interprétation des données

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

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

ou

2 3 4 8 1.2 1.6 2 4 nmol alpha/beta Naphtol ;

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

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

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

L'activité estérasique de chaque puce en µmol d'alpha-Naphthol produit/min/mg protéine est:

(alpha-Naphthol en µmol produit par 10 µl de broyat/ quantité de protéine (en mg) dans 20 µl de broyat)/30

NB: Lorsque l'activité estérasique est trop élevée (au delà de la limite de DO lue par le spectro) le broyat doit être préalablement dilué et les calculs de l'activité multipliés par le facteur de dilution.

Courbe étalon des Oxydases (Cytochrome P450)

- Cytochrome C Horse Heart type VI (Sigma C7752, MW=12 384)
- Préparer solutions mères dans l'eau

S1 : 0.1 mM = 6.2 mg Cytochrome C + 5 ml H₂O

S2 : 0.01 mM = 100 µl S1 + 900 µl H₂O

S3 : 0.001 mM = 100 µl S2 + 900 µl H₂O

- Préparer la gamme:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------|-----|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | |
| B | 2.5 pmol | 2.5 | 2.5 | | | | | | | | | |
| C | 5 nmol | 5 | 5 | | | | | | | | | |
| D | 10 nmol | 10 | 10 | | | | | | | | | |
| E | 15 nmol | 15 | 15 | | | | | | | | | |
| F | 20 nmol | 20 | 20 | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Copyright © 2009 Edita Almamena

Background = 100 µl H₂O

0.0025 nmol CytC = 37.5 µl S3 + 262.5 µl H₂O
0.005 nmol CytC = 75 µl S3 + 225 µl H₂O
0.010 nmol CytC = 150 µl S3 + 150 µl H₂O
0.015 nmol CytC = 225 µl S3 + 75 µl H₂O
0.20 nmol CytC = 300 µl S3

Avant de commencer préparer :

Solution TMBZ :

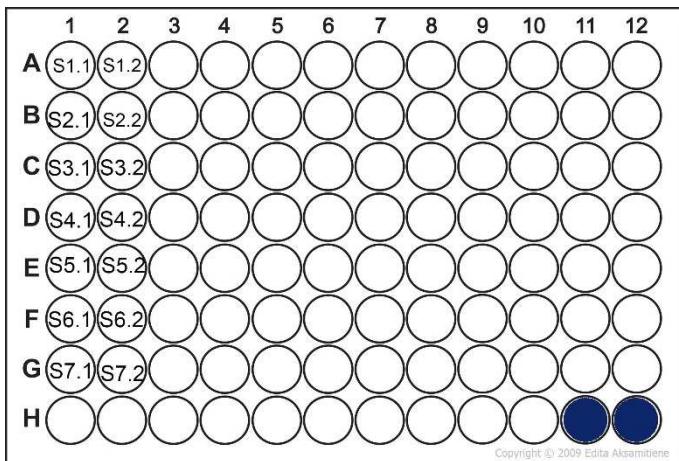
0.010 gr 3,3',5,5' Tétraméthyl Benzidine (TMBZ) dans 5ml méthanol ; bien vortexer
Déposer dans un réservoir et ajouter 15 ml Tampon 0.25M pH5.0, Sodium Acétate, mélanger à la pipette.

Solution H₂O₂ , garder au noir

350 µl H₂O₂ + 3.15 ml H₂O

- Déposer 20 µL de gamme/puit
- 80 µl de Tampon 0.0625M KHPO₄ pH 7.2 /puit
- 200 µl de solution TMBZ /puit
- 25 µl de 3% peroxyde d'hydrogène /puit
- Incuber 30 minutes à RT avec un couvercle
- Lire en point final à 630 nm

Si les DO sont faibles alors on peut prolonger l'incubation jusqu'à 45 ou 60 min et refaire une lecture (il faudra faire de même avec les échantillons)



Pour **les échantillons** suivre la même procédure avec dépôt d'échantillons en duplicat.

Les puits G12 et H12 sont réservés au blanc sur chaque plaque testée.

Interprétation

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

0.000312 0.000625 0.00125 0.001875 0.0025 nmol P450 equivalent units.

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

Ne pas oublier de sauvegarder les données de la courbe étalon et la courbe elle-même. En utilisant cette formule avec les DO des échantillons il est possible de déterminer la puce. Cette transformation est généralement faite automatiquement par les logiciels fournis avec le spectrophotomètre.

L'activité oxydasique de chaque moustique en nmol P450 equivalent units/mg protéine est:

(nmol P450 equivalent units pour 20 μ l de broyat/ (mg protéine dans 20 μ l de broyat)).

Les tests biochimiques ne sont pas toujours très reproductibles, des techniques basées sur l'étude de l'expression (quantification de l'ARNm) ont été développées ; Mais nous ne disposons pas de « marqueurs » moléculaires fiables pour toutes les familles de résistance.

Pour *An.gambiae*, il y a des évidences que les gènes CYP6M2, CYP6P3, CYP4G16 sont impliqués dans la résistance aux pyréthrinoides. GSTE2 et GSTD3 pour la résistance au DTT.

5. Gluthathion-S-Transférases

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

a. Reprendre la plaque notée GST avec **20 µl** de broyat par puit .

Préparer extemporanément : 0.013 gr de CDN (1-chloro-2,4-Dinitrobenzene)
1ml de Méthanol, bien vortexer

Puis préparer la solution GSH : 0.060 gr glutathion réduit (GSH)
20 ml de Tampon Sodium Phosphate 0.1M pH 6.5
Ajouter 1 ml de la solution de CDN.

b. Déposer 200 µl/puit

c. Lire **immédiatement** en cinétique à 340 nm pendant 5 minutes.

Interprétation des Données pour les GST

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

DO/minute = ϵcl = coefficient d'extinction molaire \times concentration \times longueur de la solution
 $\epsilon = 9.5$ pour le CDN

$I = \text{profondeur du puits} = 0.63 \text{ cm}$ pour 220 µl

Ainsi

$c = \text{concentration molaire} = (\text{DO}/\text{minute})/5.98$ ou $= (\text{milliDO}/\text{minute})/(5.98 \times 1000)$

Moles de GSH conjuguées par puit de 210 µl $x = c \times 220 \times 10^{-6}$ en mole

$x = c \times 0.22$ en millimole

x doit être rapporté à la quantité de protéines par puit c'est à dire pour 10 µl de broyat
 Finalement l'activité GST pour chaque puce en mmol de GSH conjugué/min/mg protéine est:

$((\text{milliDO}/\text{minute} \times 0.22)/(5.98 \times 1000))/\text{mg protéine dans 20 µl de broyat}$

6. Acétylcholinestérase

Avant de commencer Préparer :

- La solution DTNB : 0.008gr de DTNB (5,5' Dithio bis (2 Nitro benzoic Acid)) dans 2 ml de tampon sodium phosphate 0,1M pH7.0.
- Préparer la solution d'Acetylthiocoline iodide : peser 0.02g d'AsChI , dissoudre dans 5ml d'eau distillée.
- Répartir dans 2 réservoirs (2.5 ml)
- Ajouter 50µl de porpoxur dans le réservoir « + propoxur ».
- Reprendre la plaque Ache ou les échantillons sont déjà déposés
- Ajouter 145 µl de Tampon Sodium Phosphate 0.1M pH 7.8 + Triton 1% par puit
- Ajouter 10 µl de la solution DTNB/puit.
- 25 µl de la solution sans propoxur dans le premier puits
- 25 µl de la solution avec propoxur dans le second puits
- Incubation à RT 3 mn
- Lire en cinétique à 420 nm pendant 5 minutes.

Interprétation des données pour l'Acétylcholinestérase

- L'AChe est interprétée en utilisant le pourcentage d'inhibition de l'activité Ache par le propoxur
- Pourcentage d'inhibition = $(1 - (DO \text{ puits avec propoxur}/DO \text{ puits sans propoxur})) \times 100$
- En théorie les puces résistants (RR + RS) doivent avoir un pourcentage d'inhibition inférieur à 60-70%

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

Solutions Tampons

Les tampons sont à préparer le premier jour de la série d'expérience et sont à utiliser dans les 3 mois.

Attention utiliser seulement de **l'eau osmosée stérile** et pas de l'eau milliq qui est trop acide et ne conviendra pas pour le Ph de la solution 7 (sodium acetate pH5.0).

1. Solutions Mères

Sodium Phosphate dibasique (disodium Phosphate) Na_2HPO_4 0.1M: 14.2 gr dans 1 litre H_2O

Sodium Phosphate monobasique (monosodium Phosphate) NaH_2PO_4 0.1M : 13.8 gr dans 1 litre H_2O

Potassium Phosphate dibasique K_2HPO_4 0.0625M: 3.57 gr dans 250 ml H_2O

Potassium Phosphate monobasique KH_2PO_4 0.0625M: 2.12 gr dans 250 ml H_2O

2. Sodium Phosphate 0.05M pH 7.4 (PNPA)

350 ml Na_2HPO_4 0.1M + 350 ml d H_2O

200 ml NaH_2PO_4 0.1M + 200 ml d H_2O à ajouter à la solution précédente jusqu'à pH 7.4

3. Sodium Phosphate 0.1M pH 7.0 (AChE)

Ajouter NaH_2PO_4 0.1M à n'importe quel volume de Na_2HPO_4 0.1M jusqu'à pH 7.0

4. Sodium Phosphate 0.1M pH 7.8 + 1% Triton (AChE)

Ajouter NaH_2PO_4 0.1M à n'importe quel volume de Na_2HPO_4 0.1M jusqu'à pH 7.8 et ajouter 1 ml Triton X100 pour 100 ml de Tampon

5. Sodium Phosphate 0.1M pH 6.5 (GST)

Ajouter NaH_2PO_4 0.1M à n'importe quel volume de Na_2HPO_4 0.1M jusqu'à pH 6.5

6. Potassium Phosphate 0.0625M pH 7.2 (oxydases)

Ajouter KH_2PO_4 0.0625M à n'importe quel volume de K_2HPO_4 0.0625M jusqu'à pH 7.2

7. Sodium Acetate 0.25M pH 5.0 (oxydases)

Diluer 25 ml de Sodium Acetate 3M pH 5.0 avec 275 ml d H_2O , et ajuster à pH 5.0 avec HCl si nécessaire.

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

Dans 800 ml d'eau distillée, dissoudre:

| Réactif | Quantité pour solution 1X en g | Concentration finale |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| NaCl | 8 g | 137 mM |
| KCl | 0.2 g | 2.7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 g | 10 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.24 g | 1.8 mM |
| | | |

Ajuster à pH 6.5 avec HCl

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

Tous les tampons 1 à 8 peuvent être stockés à température ambiante plusieurs mois

9. Autres solutions à conserver à 4°C

- Alpha- ou Beta-Naphthyl Acétate 0.06M : 0.0559 gr dans 5 ml d'éthanol
- Propoxur 0.012M : 0.025 gr dans 10 ml acétone
- Para nitrophényl acétate 0.2M : 0.362 gr dans 10 ml acetonitrile (utiliser des gants)

Détermination génétique d'allèle de résistance sur exuvie nymphale

Principe du test : Ce test a pour but d'identifier/sélectionner les individus homozygotes résistant pour un allèle dominant (ACE-1R ou kdr) dans le but généralement de purifier une colonie comme créer une souche homozygote résistante. Il s'agit d'identifier à l'émergence les individus ayant le génotype voulu afin de les grouper en cage pour créer la nouvelle population.

Matériels :

Moustiques au stade nymphal

La quantité nécessaire dépend de la fréquence allélique dans la population de départ

Pilulier tubes à drosophile portoir, tube et bouchon ou coton

Distributeur d'eau (2-10ml)

Eppendorf 1,5 ml autoclavé

Tampon d'extraction (CTAB)

Billes d'acier

Pot carton 10cl obturé avec un voilage et un trou pour mettre le moustique

Pipettes de transfert

Déroulement du test :

Distribuer 3ml d'eau osmosée dans les tubes à drosophile

Distribuer une nymphe par tube

Boucher le tube à drosophile avec le coton

Maintenir les tubes dans les conditions d'élevage jusqu'à émergence

Préparer autant de tubes eppendorf avec 200µl tampon d'extraction et 2 billes d'acier que de moustiques ayant émergé

Préparer autant de pots en carton que de moustiques émergés.

Numérotter les eppendorf et les pots en carton avec le même code

Lorsque les moustiques ont émergé :

Prélever l'adulte du tube à drosophile et le mettre dans un pot carton numéroté

Prélever dans le tube à drosophile l'exuvie avec une pipette de transfert à usage unique, Limiter au maximum la quantité d'eau prélevée.

Déposer l'exuvie dans un tube eppendorf portant le même code que celui du pot carton contenant l'adulte.

Laisser la pipette de transfert dans le tube à drosophile

Répéter l'opération pour l'ensemble des adultes émergés.

Extraire les exuvies selon le protocole classique d'extraction utilisé pour le contrôle de souches (voir le manuel insectarium).

Déterminer la présence de l'allèle Ace1 et kdr par qPCR comme décrit dans le manuel insectarium section contrôle de souche.

En fonction des résultats obtenus individuellement par qPCR , regrouper les individus ayant le génotype souhaité.