

REPUBLIQUE DU BENIN

\*\*\*\*\*

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

\*\*\*\*\*

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE ZOOLOGIE

\*\*\*\*\*

**LICENCE EVOLUTION, BIODIVERSITE DES  
ARTHROPODES ET ASSAINISSEMENT**

\*\*\*\*\*

**RAPPORT DE FIN DE STAGE DE FORMATION PROFESSIONNELLE**

Thème

**Evaluation de l'efficacité et de la durabilité des moustiquaires imprégnées  
d'insecticide à longue durée d'action (DuraNet) dans la commune de Ouèssè, Bénin**

**Réaliser et présenté par :**

**GOMAVO Constant**

**Sous la supervision de :**

**Martin C. AKOGBETO**

Professeur Titulaire en Entomologie

Médicale et Vétérinaire

**COMPOSITION DU JURY**

**Président : Prof. Alphonse ADITE**

**Membres : Prof. Jean-Marc ATEGBO**

**Prof. Martin AKOGBETO**

**C.R.E - COTONOU**

**CENTRE DE RECHERCHE ENTOMOLOGIQUE DE COTONOU**

**1ère Promotion**

**Année académique: 2015-2016**

## **Remerciements**

Qu'il nous soit permis d'adresser ici, nos sincères remerciements à tous ceux qui ont apporté de diverses manières, leur contribution à la réalisation de ce rapport. Nous tenons essentiellement à remercier:

-Monsieur Martin C. AKOGBETO, Professeur Titulaire au département de Zoologie à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi, Directeur du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) et coordonnateur de la formation professionnelle Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA).

Je n'aurais pas eu la chance de faire partie de la première promotion de la LEBA et faire cette formation sans vos encouragements et soutiens constants. Mon cher Professeur, votre calme, votre diplomatie, votre rigueur scientifique et la qualité de vos observations constituent un modèle à suivre. Sincère merci pour la création de la LEBA, une formation professionnelle qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

-Monsieur Michel SEZONLIN, Maître de Conférences à l'Université d'Abomey-Calavi, Coordonnateur Adjoint de la LEBA pour vos multiples conseils et votre rigueur scientifique pour la réussite de cette formation.

-Tous les membres de l'équipe pédagogique de la LEBA pour l'initiative de la création de cette formation professionnelle de même que tous les enseignants de cette dernière.

-Tous les membres du jury pour avoir disposé de temps pour évaluer ce rapport de stage ce vendredi, 19 Mai 2017 de 12 :00 à 14 :00.

-Monsieur Idelphonse Bonaventure AHOGNI, pour avoir accepté de m'encadrer au cours de mon stage.

-Depuis 3 mois, le CREC est devenu ma seconde famille et je tiens à remercier tous les étudiants, techniciens et personnels administratifs du CREC pour leur sympathie, leur aide et leur franche collaboration.

-Mon père Antoine GOMAVO et ma mère Victorine KODJO pour leur soutien moral, financier, matériel et spirituel de même que leur encouragement.

-Mes frères et sœurs, Rémi, Véronique, Adèle, Abiguelle, Jocelyne; Isabelle Akuavi TOGBE et Claude TOÏSSIN pour leur soutien moral.

-Mes camarades de la LEBA et en particulier Caroline ABALLO pour sa franche collaboration.

-Toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont soutenu d'une manière ou d'une autre, que le seigneur Jésus-Christ de Nazareth vous bénisse.

## **Résumé**

Notre stage a été effectué au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou. L'objectif de ce stage est de renforcer nos capacités d'ordre pratique dans les domaines de la recherche et de la vie professionnelle. De façon spécifique il s'agit de se familiariser avec les différents outils de laboratoire dans un centre de recherche, et mûrir des réflexions sur un sujet de recherche ayant rapport avec les problèmes actuels qui minent le développement de notre pays. Ainsi, nous avons mené plusieurs activités parmi lesquelles il y a: les prospections larvaires, l'élevage des moustiques, le test en cône selon le protocole de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le test en tunnel et le test en tube. Ensuite, l'extraction de l'ADN des moustiques nous a permis de faire la PCR et le test ELISA. Enfin, nous avons également participé aux séminaires de formation et de présentation hebdomadaire des travaux de recherches ou des présentations d'articles scientifiques. Toutes ces activités nous ont permis de faire une bonne réflexion sur l'évaluation de l'efficacité et de la durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (DuraNet) dans la commune de Ouèssè. Après la survie, l'intégrité physique, la bio-efficacité de ces moustiquaires et les facteurs associés à la chute de chacun de ses paramètres, il ressort que les MIILDs sont très peu efficaces parce que les insecticides dont elles sont imprégnées n'arrivent pas à tuer les moustiques qui piquent la population de cette localité, certaines personnes ne respectent pas les notices d'utilisation de ces moustiquaires, elles ne durent pas avant de présenter plusieurs trous. Ainsi, les moustiquaires utilisées à Ouèssè ne répondent pas aux standards de l'OMS en matière d'efficacité et de durabilité.

**Mots clés: Efficacité, durabilité, MIILDs, Ouèssè.**

## **Abstract**

Our practicum has been done in the center of Entomological Research of Cotonou. The objective of this practicum reinforce our capacities of convenient order in the domains of research and the professional life. In a specific way it is about familiarizing itself/themselves with the different tools of laboratory in a center of research, and to nurture reflections on a topic of research having report with the present problems that mine the development of our country. Thus, we had led several activities among which there is: the larval prospecting's, the raising of the mosquitos, the test in cone according to the protocol of the World organization of Health (WHO), the test in tunnel and the test in tube. Then, the extraction of the DNA of the mosquitos allowed us to make the test of PCR and the test of ELISA. Finally, we had also participated in the seminaries of formation and weekly presentation of the works of research or the presentations of scientific articles. All these activities allowed us to make a good reflection on the assessment of the efficiency and the durability of the screens impregnated of insecticide to long length of action (DuraNet) in the township of Ouèssè. After the survival, the physical integrity, the bio-efficiency of these screens and the factors associated to the fall of each of his/her/its parameters, he/it comes out again that the MIILDs are very little efficient because the insecticides of which they are impregnated don't manage to kill the mosquitos who prick the population of this locality, some people don't respect the notes of use of these screens, they don't last before presenting several holes or torn or spoiled completely. Thus, the screens used in Ouèssè not to answer the standards of the WHO concerning efficiency and durability.

**Key words: Efficiency, durability, MIILDs, Ouèssè.**

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>i</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
Figure 1: Organigramme du CREC.....	vi
Figure 2: Schéma de l'élevage des moustiques.....	vi
Figure 3: Carte montrant la commune de Ouèssè .....	vi
<b>Liste des photos</b> .....	<b>vii</b>
Photos 1: Prospection et élevage de moustiques à l'insectarium du CREC .....	vii
Photo 2: Extraction et amplification d'ADN .....	vii
Photo 3: Dispositif de migration du produit PCR .....	vii
Photo 4: Plaque ELISA après action du substrat de la peroxydase (CREC 2012) .....	vii
Photo 5: Plaque ELISA après blocage de la réaction avec H <sub>2</sub> O (CREC 2012) .....	vii
Photo 6: Différentes étapes du test en cône .....	vii
Photo 7: Test en tunnel .....	vii
Photos 8: Différentes catégories de trous sur les moustiquaires .....	vii
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>ix</b>
<b>1-Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>2-Objectifs du stage</b> .....	<b>1</b>
2-1-Objectif général.....	1
2-2-Objectifs spécifiques .....	2
<b>3-Description du lieu de stage</b> .....	<b>2</b>
3-1-Cadre physique .....	2
3-2-Personnel .....	3
<b>3-3-Quelques thématiques de recherche du CREC</b> .....	<b>4</b>
<b>3-4-Activités menées</b> .....	<b>5</b>
3-4-1-Insectarium .....	5
3-4-2-Le laboratoire d'Entomologie Appliquée.....	8
3-4-3-Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biochimie.....	8
3-4-3-1-Extraction de l'ADN.....	8
3-4-3-2-Principe de la PCR.....	9

3-4-3-3-Migration du produit PCR.....	10
3-4-3-4-ELISA-CSP (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay- CircumSporozoïtique) .....	10
3-4-4-Laboratoire de contrôle de qualité des outils de lutte antivectorielle .....	12
3-4-4-1-Test en cône.....	12
3-4-4-2-Test en tunnel .....	13
3-4-5-Laboratoire de Parasitologie.....	14
3-4-6-Laboratoire des tests de sensibilité des moustiques aux insecticides .....	14
2-4-7-Autres activités .....	14
<b>3-5-Difficultés rencontrées au cours du stage .....</b>	<b>14</b>
<b>4-Choix d'un sujet de recherche .....</b>	<b>14</b>
<b>4-1-Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>4-2- Synthèse bibliographique.....</b>	<b>16</b>
<b>4-3- Méthodologie .....</b>	<b>17</b>
4-3-1-Situation géographique du site d'étude.....	17
4-3-2-Type de moustiquaire impliquée dans l'étude .....	18
4-3-3-Recensement des ménages et distribution des MIILDs .....	18
4-3-4-Sélection des ménages et marquage des MIILDs.....	18
4-3-5-Procédure de collecte de données .....	19
4-3-6-Enquête prospective et questionnaire.....	19
4-3-7-Suivi de la présence /absence des moustiquaires marquées dans les ménages .....	19
4-3-8--Suivi de l'intégrité physique.....	20
4-3-9-Questionnaire d'interview.....	20
4-3-10-Evaluation de la bio-efficacité par la Chromatographie gazeuse (GC) .....	21
4-3-11-Analyse de données.....	21
<b>4-4- Résultats attendus .....</b>	<b>23</b>
<b>5- Conclusions et perspectives.....</b>	<b>23</b>
<b>6-Références.....</b>	<b>24</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>25</b>

<b>Liste des figures</b>	<b>Pages</b>
Figure 1: Organigramme du CREC.....	4
Figure 2: Schéma de l'élevage des moustiques.....	7
Figure 3: Carte montrant la commune de Ouèssè.....	18

<b>Liste des photos</b>	<b>Pages</b>
Photos 1: Prospection et élevage de moustiques à l'insectarium du CREC.....	6
Photo 2: Extraction et amplification d'ADN.....	9
Photo 3: Dispositif de migration du produit PCR.....	10
Photo 4: Plaque ELISA après action du substrat de la peroxydase (CREC 2012).....	12
Photo 5: Plaque ELISA après blocage de la réaction avec H <sub>2</sub> O (CREC 2012).....	12
Photo 6: Différentes étapes du test en cône.....	13
Photo 7: Test en tunnel.....	13
Photos 8: Différentes catégories de trous sur les moustiquaires.....	20

## **Liste des sigles et abréviations**

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**CAME:** Centrale d'Achats des Médicaments Essentiels

**CENATEL:** Centre National de Télédétection

**CREC:** Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

**DRF:** Direction de la Recherche et de la Formation

**EDSV:** Ecole Doctorale Sciences de la Vie

**ELISA:** Enzym Linked Immuno Sorbent Assay

**FAST:** Faculté des Sciences et Techniques

**Kdr:** Knock-down resistant

**LEBA:** Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement

**MIE:** Master International en Entomologique

**MIILD:** Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'action

**MR:** Methods in Anopheles Research

**MS:** Ministère de la Santé

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**ONG:** Organisation Non Gouvernementale

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PDC:** Plan de Développement de la Commune

**PHI:** Proportionate Holes Index

**PNLP:** Programme National de Lutte contre le Paludisme

**PNUD:** Programme des Nations Unies pour le Développement

**PSNLP:** Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme

**RBM:** Roll Back Malaria

**RGPH:** Recensement Général de la Population et de l'Habitat

**SOBEPEC:** Société Béninoise des Peintures et Colorants

**UAC:** Université Abomey-Calavi

**WHO:** World Health Organization

## **Liste des annexes**

Protocole d'extraction d'ADN sur moustique entier

Protocole de la PCR

Protocole du test ELISA-CSP

## **1-Introduction**

Les Arthropodes ont une place considérable dans le monde animal avec plus de 1.5 millions d'espèces connues. Ils représentent environ 4/5 de la biosphère. Ces êtres vivants se trouvent dans tous les milieux (aquatiques et terrestres), sous tous les climats, altitudes ou profondeurs. Leur présence et leur prolifération sont dues au défaut de l'assainissement du cadre de vie des hommes. C'est donc pour apporter une solution à cet état de chose que la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), établissement d'enseignement supérieur et professionnel ayant statut de grande Faculté, à travers l'initiative d'éminents Professeurs du département de Zoologie a créé une nouvelle formation professionnelle LEBA (Licence Evolution, Biodiversité des Arthropodes et Assainissement). Elle a pour but de former des jeunes capables de faire face au défi de protection, de conservation ou de lutte contre les Arthropodes surtout nuisibles, ainsi que l'assainissement de notre cadre de vie.

La formation en LEBA se complète par un stage de trois mois dans un laboratoire de recherche. Celui-ci constitue une étape obligatoire pour l'obtention du diplôme. Dans le cursus de la formation, le stage est conçu comme un processus d'immersion réelle dans la fonction opérationnelle tant dans ses dimensions scientifiques, techniques que professionnelles. Nous avons choisi effectuer notre stage au sein du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) du 03 Novembre au 03 Février 2017 qui travaille sur les mots clés ou les points saillants de notre formation. Au cours de ce stage, nous avons réalisé un ensemble de tâches ayant trait à différents domaines opérationnels de la recherche. En quoi consistent ces tâches? Quelles sont leurs utilités?

Ce rapport, après une présentation du CREC en première partie, clarifie les différentes tâches effectuées, puis démontre leurs utilités en réfléchissant sur une thématique de recherche scientifique.

## **2-Objectifs du stage**

### **2-1-Objectif général**

Renforcer nos capacités d'ordre pratique dans les domaines de la recherche et de la vie professionnelle.

## **2-2-Objectifs spécifiques**

De façon spécifique, il s'agit de se familiariser avec les différents outils de laboratoire dans un centre de recherche, et mûrir des réflexions sur un sujet de recherche qui contribuerait à un changement de comportement de la population béninoise.

## **3-Description du lieu de stage**

### **3-1-Cadre physique**

Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) est le cadre où se sont déroulés nos travaux de laboratoire. Ce centre est situé dans la zone industrielle de la commune de Cotonou à Akpakpa (PK3), dans l'enceinte du Ministère de la Santé en face de la SOBEPEC. Il fait corps avec le Service National des Laboratoires de Santé Publique. Le CREC est sous la tutelle de la Direction de la Recherche et de la Formation (DRF) du Ministère de la Santé. La mission du CREC est essentiellement axée sur trois domaines d'activités: la recherche, la formation et l'appui à l'état.

Les activités de recherche comprennent: la recherche appliquée et la recherche fondamentale. La recherche appliquée concerne essentiellement les activités de lutte contre les vecteurs et les parasites du paludisme. Au nombre de ces activités de lutte, nous pouvons citer l'évaluation de l'efficacité des outils de lutte comme les MIILDs, les pulvérisations intra domiciliaires d'insecticide (PID), en case expérimentale et à l'échelle communautaire, l'évaluation du niveau de sensibilité des vecteurs aux insecticides et des mécanismes impliqués dans la résistance des moustiques; l'évaluation de la résistance du *Plasmodium falciparum* aux anti-malariques ; l'évaluation de l'efficacité des nouveaux médicaments contre le paludisme. La recherche fondamentale prend en compte la bio écologie des vecteurs sur des aspects tels que l'étude des mécanismes d'adaptation des vecteurs aux habitats inhabituels et inappropriés puis, aux saisons sèches de longue durée.

Le CREC est un centre de formation en entomologie médicale et vétérinaire. A ce titre, il a organisé de 2007 à 2012 le Master International d'Entomologie Médicale et Vétérinaire (MIE) dont les cours ont été abrités par l'Institut Régional de Santé Publique (IRSP) de Ouidah. Le MIE a été organisé en collaboration avec l'Université de Montpellier (France). Par ailleurs, le CREC intervient aussi à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) depuis 2007 dans la formation des étudiants en Entomologie Médicale et Vétérinaire. Ces deux formations ont été mises en place afin de répondre aux

besoins de compétences nécessaires pour faire face à la menace des maladies émergentes à transmission vectorielle. De ce fait, il reçoit chaque année des étudiants niveau Master dans le cadre des cours théoriques et des stages pratiques. Des étudiants en thèse de doctorat y sont également formés chaque année en collaboration avec l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie (EDSV) de l'UAC.

Le CREC appuie les différents programmes Nationaux de Lutte contre les maladies à transmission vectorielle dans la mise en œuvre de leur plan stratégique étudie la faisabilité, en évaluant l'impact de la mise en œuvre des stratégies de luttés sur la transmission des maladies et fait les recommandations nécessaires.

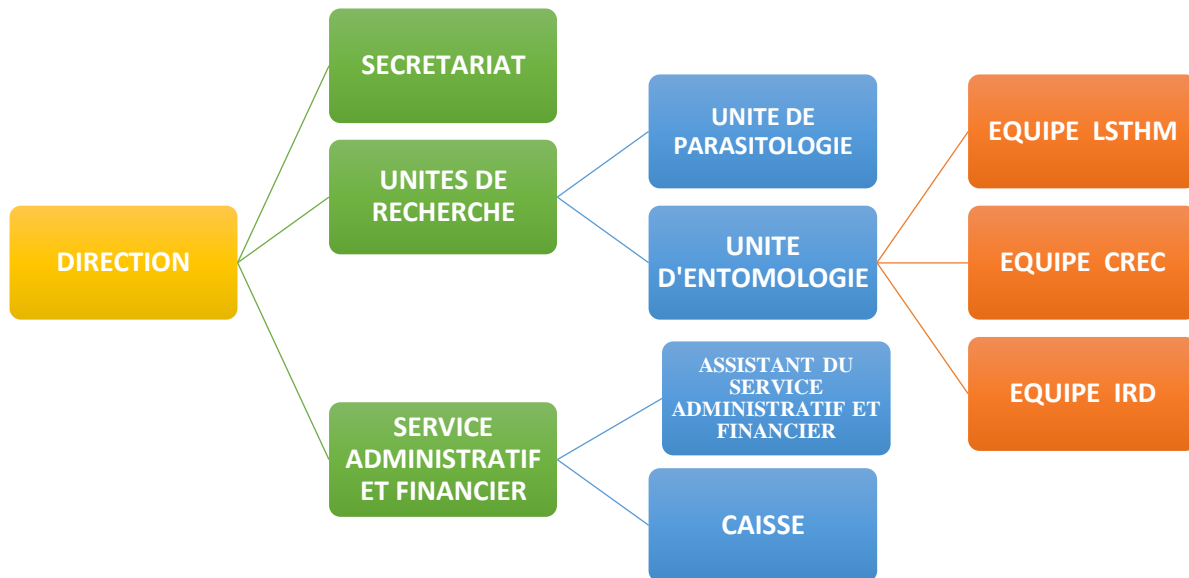
L'unité entomologique au sein duquel a lieu notre stage est subdivisée en plusieurs secteurs ou services. Au nombre de ces services, nous avons:

- ❖ Le laboratoire de Biologie moléculaire;
- ❖ Le laboratoire de contrôle de qualité;
- ❖ Le laboratoire des tests insecticides;
- ❖ Laboratoire d'écologie, vecteur et parasitaire;
- ❖ Laboratoire d'entomologie appliquée;
- ❖ Un insectarium.

### **3-2-Personnel**

Le CREC est dirigé par son Directeur en la personne du Professeur Martin C. AKOGBETO. Il est à la tête d'une équipe dynamique formée de plusieurs secteurs assumés par des responsables.

- Un Directeur, Professeur titulaire des universités du CAMES,
- Un secrétariat,
- Des coordonnateurs de recherche et chercheurs (laboratoires de recherches),
- Un chef du service administratif et financier et ses assistants-comptables (Service Administratif et financier).



**Figure 1: Organigramme du CREC (CREC 2016)**

### 3-3-Quelques thématiques de recherche du CREC

Le CREC travaille sur plusieurs thématiques. Il s'agit entre autres de:

- L'impact de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité opérationnelle des moustiquaires imprégnées dans le département du plateau, Bénin.
- Déterminants environnementaux de la répartition spatiale des vecteurs du paludisme et autres moustiques vecteurs des maladies dans la zone sanitaire Ouidah, Kpomassè.
- Contrôle de *Anopheles gambiae* (*diptera, nematocera, culicidae*) vecteurs du paludisme par le bendiocarbe en pulvérisation intradomiciliaire à grande échelle dans le département de l'Ouémé, Bénin.
- Variabilité de la transmission du paludisme, de la durabilité et l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides en fonction des faciès éco-géographique en zone de savane et de forêt dégradé au Bénin, Afrique de l'Ouest.
- Modification physiologique et comportementale induite par la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme au Bénin

-Evolution des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme après l'arrêt de la pulvérisation intradomiciliaire dans le département de l'Ouémé au Bénin.

-Utilisation des carbamates et des organophosphorés en pulvérisation intradomiciliaire : impact sur la transmission du paludisme et dynamique de la résistance aux insecticides chez *Anopheles gambiae* au Bénin, Afrique de l'Ouest.

-Diversité culicidienne et les risques encourus par la population en Arbovirose.

-Portage des mutations Kdr et Ace-1 et sensibilité des formes moléculaires de *Anopheles gambiae* aux matériaux imprégnés d'insecticides.

-Etude comparative de deux techniques de détermination de l'âge physiologique des moustiques: la présence de granulations dans le corps basal et l'aspect des trachéoles.

-Contrôle de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides en fonction du faciès géographique en zone de savane au Bénin, Afrique de l'ouest.

-Evaluation du niveau de résistance de *Anopheles gambiae* aux insecticides dans les sites sentinelles sur le transect Nord-Sud du Bénin.

-Effet de l'utilisation des intrants agricoles sur le développement des larves et l'émergence de la résistance de *Anopheles gambiae*.

### **3-4-Activités menées**

Au cours de notre stage, certaines activités sont menées aussi bien sur le terrain qu'au laboratoire. Les travaux que nous avons menés sont de divers ordres.

#### **3-4-1-Insectarium**

##### **➤ L'élevage des moustiques**

Après les prospections larvaires sur le terrain et plus précisément dans la ville de Cotonou (1), l'élevage des moustiques a été fait à l'insectarium du CREC. Plusieurs types de moustiques ont été élevés. Il s'agit de: *Aedes*, *Culex*, et *Anopheles*. Ainsi dans ce laboratoire, les larves sont triées, séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs étiquetés contenant de l'eau

(2). Elles sont réparties en moyenne par lot de 100 par bac pour optimiser non seulement leur croissance mais aussi pour éviter le cannibalisme. Les larves sont nourries avec des croquettes de chat (5 grammes mélangés dans un bac de 500 ml d'eau de gîte larvaire pour 80 larves d'anophèles) qui sont des aliments riches en protéine et en sels minéraux. Chaque bac est recouvert de toile moustiquaire et entreposé dans une salle dont l'humidité relative varie entre 70 et 80% et la température entre 25 et 30°C. La photopériode est assurée par des lampes fluorescentes éclairant de 6:00 heures du matin à 6:00 heures du lendemain. A l'apparition des nymphes, elles sont prélevées et mises dans une cage cubique de 30 cm de côté pour l'émergence des adultes (3). Les adultes issus de l'émergence des larves collectées sur le terrain et mis en cage sont nourris au jus de miel (10 %) (4). Les femelles adultes de 2 à 5 jours sont isolées pour être soumises aux tests de sensibilité/résistance aux différents insecticides. Les photos ci-dessous illustrent les étapes d'élevage des moustiques à l'insectarium.



**Photo 1 : Prospection et élevage de moustiques à l'insectarium (CREC 2016)**

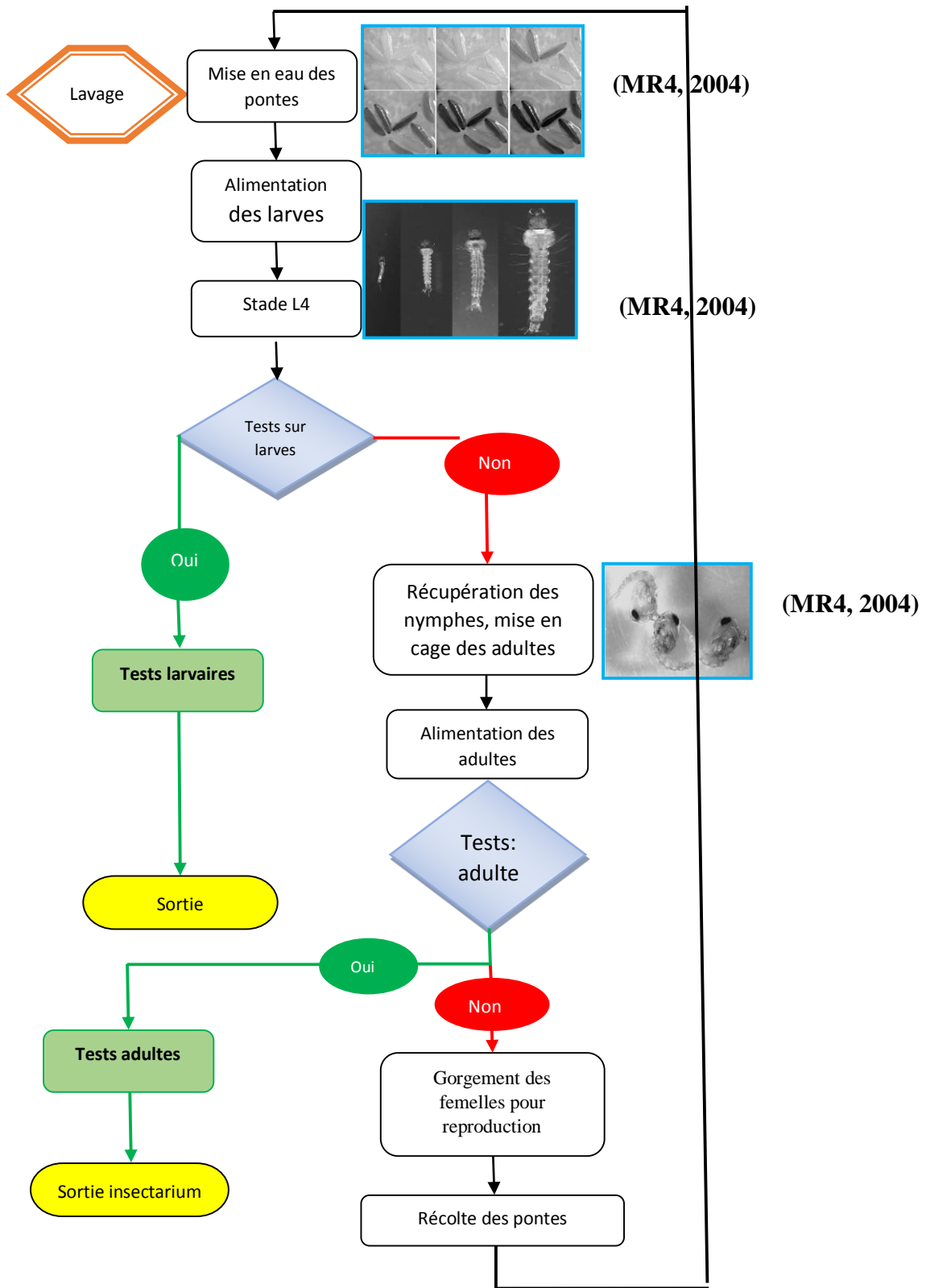


Figure 2: Schéma de l'élevage des moustiques (CREC 2016)

### **3-4-2-Le laboratoire d'Entomologie Appliquée**

Dans le laboratoire de d'Entomologie Appliqué, nous avons assisté à une séance d'information. Ce laboratoire de recherche travaille essentiellement sur les vecteurs de paludisme. Les chercheurs de ce laboratoire utilisent comme moyen de lutte contre ces vecteurs, la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide (PID). Nous avons appris qu'après la capture des moustiques sur le terrain, on procède à l'identification c'est-à-dire séparer les vecteurs du paludisme (*Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*) des autres moustiques. La précision de la date, l'heure de capture et la localité de provenance sont d'une importance capitale. Ainsi, les ovaires des femelles de *Anopheles gambiae s.l* capturés sur appât humain sont disséqués pour évaluer l'âge physiologique de la femelle en observant le degré d'enroulement des trachéoles (Detinova et al., 1964). La dissection de l'abdomen et l'observation au microscope de la morphologie des ovaires permettent de déterminer si:

- la femelle de *Anopheles gambiae s.l* a pondu des œufs au moins une fois dans sa vie, dans ce cas il est pare;
- la femelle de *Anopheles gambiae s.l* n'a jamais pondu d'œufs, alors il est nullipare.

Ceci permet d'estimer les taux de parturité de la population de *Anopheles gambiae s.l*, c'est-à-dire la proportion de femelles paires. Ce paramètre reflète l'âge de la population des moustiques. Les populations de *Anopheles gambiae s.l* plus âgées présentent des taux de parité plus élevés. Les populations plus âgées sont davantage susceptibles de transmettre le paludisme parce qu'elles ont vécu suffisamment longtemps pour permettre au parasite de se développer.

### **3-4-3-Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biochimie**

Dans le laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biochimie, nous avons fait les différents tests suivants: extraction d'ADN, la PCR et le test ELISA.

#### **3-4-3-1-Extraction de l'ADN**

L'ADN a été extrait au CTAB à 2%. Nous avons broyé individuellement les moustiques entiers dans 200 ml de CTAB à 2%. Après 5 mn au bain-marie à 65°C, nous avons mélangé le broyat avec 200 ml de chloroforme puis centrifuger à 14000 tours par minute pendant 5 mn. Le surnageant a été délicatement récupéré dans un autre tube avec 200 ml d'isopropanol puis centrifuger à 12000 tours par minute pendant 15 minutes. Le culot a été conservé avec 200 ml d'éthanol à 70%. L'ensemble a été centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5 mn. Le

contenu du tube a été délicatement renversé afin de conserver le culot qui était ensuite séché pendant au moins 3 heures sur la paillasse. Enfin, 20 ml d'eau bi-distillée ont été ajoutée au culot, laissé en suspension sur la paillasse pendant toute la nuit ou une demi- journée (voir protocole en annexe).



**Broyage des moustiques pour extraction d'ADN**



**Echantillon passé à la centrifugation**



**Photo 2: Extraction et amplification d'ADN (CREC 2017)**

### **3-4-3-2-Principe de la PCR**

La PCR est une technique d'amplification d'ADN qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Elle est basée sur l'utilisation de deux amorces de 27 séquences courtes qui s'hybrident à des sites complémentaires en orientations inversées sur les deux brins d'ADN encadrant la région à amplifier. Un programme de PCR comporte une phase initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 min; elle est suivie de 35 cycles et une phase d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Chaque cycle de PCR comporte trois étapes définies comme suit: on procède à une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 3 mn, suivie de 35 cycles comprenant chacun une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une phase d'hybridation des amorces à 55°C pendant 30 s et une phase d'élongation à 72°C pendant 30 s.

A la fin de l'ensemble des cycles, on a une phase finale d'élongation à 72°C pendant 5 mn (voir protocole en annexe).

### **3-4-3-3-Migration du produit PCR**

Le produit PCR a été migré dans un gel préparé en mélangeant 3 à 4 g d'agarose et 200 ml de TBE 1X dans un Erlen. Ce mélange a été mis dans une micro-onde et surveillé jusqu'à l'ébullition. Après l'ébullition, le mélange a été refroidi jusqu'à 45°C environ et 12 pl de BET ont été ajoutés. Le gel a été coulé dans un plateau de moulage dans lequel des puits sont réalisés à l'aide des peignes. Au bout de 30 mn environ, le gel déjà refroidi et solide sera déposé dans la cuve de migration contenant le tampon TBE. 18 pl du produit PCR ont été mélangé à 5 pl de Bleu de Bromophénol et déposés dans chaque puits. A la fin de la migration, l'estimation de la taille des fragments d'ADN a été faite sous l'ultra-violet par comparaison de la hauteur de migration de la bande de chaque échantillon avec l'échelle de différentes tailles moléculaires chargées simultanément dans d'autre puits (voir protocole en annexe).



**Photo 3: Dispositif de migration du produit PCR (CREC 2012)**

### **3-4-3-4-ELISA-CSP (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay- CircumSporozoïtique)**

Le test ELISA permet de détecter la protéine CS qui recouvre la surface externe du sporozoïte du paludisme et constitue donc un indicateur de l'état infectieux du parasite du paludisme. La protéine CS commence à être exprimée quand le sporozoïte est encore dans l'oocyste mature, dans l'intestin du moustique. On n'analyse donc que les têtes et les thorax des moustiques femelles pour s'assurer que, si la protéine CS est détectée, elle provient très probablement de sporozoïtes qui ont atteint les glandes salivaires et la femelle est donc prête à transmettre les parasites du paludisme. Pour faire ce test, nous avons laissé les têtes et thorax des moustiques

dans 20 µl NP40/BB (Blocking Buffer) pendant 1 heure dans 20 µl NP40/BB (Blocking Buffer). Après les 1 heures, nous les avons broyés individuellement. Cette solution a été obtenue en mélangeant 2 ml de BB avec 25 µl d'Igepal630. Nous avons complété deux fois le broyat avec 190 ml au cours du broyage. Les 96 puits de chaque plaque ont été d'abord sensibilisés avec des anticorps de capture anti CSP. La solution pour la sensibilisation a été obtenue en mélangeant 15 µl d'anticorps monoclonal avec 5 ml de PBS (Phosphate 44 Buffered Saline). Cinquante (50) µl de cette solution ont été déposés dans chaque puits de la plaque et y ont été laissés pendant toute la nuit sur la paillasse ou pendant tout le week-end au réfrigérateur. Le jour suivant, nous avons vidés les puits sans les lavés. Après cela, nous avons mis 200 ml de BB dans chaque puits, laissé pendant 1 heure. Ensuite, nous avons vidé les puits sans les laver en y ajoutant 50 µl de broyat de moustique de chaque puits. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, les puits ont été vidés et lavés 2 fois avec du PBS/Tween 20 obtenu en mélangeant 500 µl de tween 20 avec 1 L de PBS. Chaque puits a reçu ensuite 50 µl d'anticorps conjugués à la peroxydase pendant 1 heure.

L'anticorps conjugué à la peroxydase a été reconstitué à partir d'anticorps monoclonaux dans un mélange d'eau distillée et de glycérol à volume égal. 7,5 µl de l'anticorps reconstitué ont été mélangés à 5 ml de BB. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les puits ont été vidés et lavés 4 fois avec le PBS/Tween 20, 100 µl du substrat de la peroxydase ont été ensuite déposés dans chaque tube. Ce substrat est un mélange de 5 mg d'ortho-tolidine dans 0,25 ml de N, N-diméthylformamide, de 30 ml de tampon citrate et de 12 µl d'eau oxygénée à 10%. La réaction se déroule à l'obscurité pendant 30 minutes. Au bout de ces 30 minutes, les puits positifs prennent une coloration bleue (Photo 4). Cette réaction a été bloquée avec l'acide sulfurique 4N. Les puits positifs prennent alors une coloration jaune (Photo 5). Les yeux ne pouvant pas détecter avec précision la coloration ou non des puits, les plaques ont été lues à l'aide d'un lecteur automatique de plaque ELISA à 405 nm. Des moustiques en élevage au laboratoire ont été broyés pour servir de témoins négatifs. L'antigène du *Plasmodium falciparum* à 2pg/µl de BB a été utilisé comme témoin positif. Après la lecture avec un lecteur de plaque, nous avons considéré comme positifs, des puits dont la densité optique a été supérieure au triple de la moyenne des densités optiques des témoins négatifs. Les puits ayant une densité comprise entre 2 et 3 fois la moyenne de la densité des témoins négatifs ont été considérés comme douteux et repassés (voir protocole en annexe).



**Photo 4: Plaque ELISA après action du substrat de peroxydase (CREC 2012)**



**Photo 5: Plaque ELISA après blocage de la réaction avec H<sub>2</sub>O (CREC 2012)**

### **3-4-4-Laboratoire de contrôle de qualité des outils de lutte antivectorielle**

#### **3-4-4-1-Test en cône**

Le test en cône permet d'évaluer l'efficacité des insecticides ainsi que leur rémanence sur des matériaux imprégnés. Il a été réalisé suivant le protocole actualisé de l'OMS. Pour réaliser ce test, nous avons fixé deux cônes standards sur chacune des faces de la moustiquaire (1). Nous avons introduit dans chaque cône, cinq à huit femelles de Kisumu non gorgées et âgées de 2 à 5 jours sur la moustiquaire pendant 3 minutes (2). Après l'exposition, nous avons retiré les moustiques des cônes à l'aide d'un aspirateur puis transférés dans des gobelets stériles voilés sur lesquels ont été déposés des tampons de coton imbibés de jus sucré (solution de sucre 10%) (3). Après cela, une lecture de Knock-down (moustiques tombés sur le dos) a été faite toutes les 05 minutes et ceci pendant 60 minutes. Après 24 heures de mise en observation, les taux de mortalités ont été enregistrés. Les essais biologiques ont été effectués à une température de 25 +/- 2 ° C et une humidité de 70 +/- 10%.



**Photo 6: Différentes étapes du test en cône (CREC 2016)**

### **3-4-4-2-Test en tunnel**

Ce test permet d'évaluer la présence de l'insecticide dans les supports imprégnés. Le test en tunnel est utilisé pour compléter les résultats du test en cône afin d'avoir des informations additionnelles sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. Cent femelles d'*Anopheles gambiae* âgées de 5 à 8 jours sont transférées dans un tunnel au bout duquel se trouve un appât (cobaye) sur lequel elles doivent se nourrir. Avant d'atteindre le cobaye, les moustiques doivent traverser des fragments de moustiquaires imprégnées perforées. Les moustiquaires imprégnées sont découpées en fragments de 20 cm de côté qui sont utilisés pour ce test. Les taux de mortalité liée au contact libre des moustiques avec les moustiquaires imprégnées sont déterminés après une nuit (15 heures) d'observation des femelles d'anophèles dans le tunnel.



**Photo 7: Test en tunnel (CREC 2016)**

### **3-4-5-Laboratoire de Parasitologie**

Le laboratoire de parasitologie s'investit dans la recherche et l'identification des parasites chez les patients dans les formations sanitaires. Ce qui permet l'actualisation des informations parasitaires pour une meilleure prise en charge des malades. Nous n'avons pas pu travailler dans ce laboratoire à cause de la courte durée du stage.

### **3-4-6-Laboratoire des tests de sensibilité des moustiques aux insecticides**

Les tests de sensibilités ont pour but d'évaluer et de suivre le niveau de sensibilité (ou de résistance) des moustiques d'une espèce vis-à-vis d'un insecticide. Ils permettent ainsi de comparer l'efficacité de plusieurs insecticides vis-à-vis d'une espèce de moustique donnée et vice versa.

#### **Test en tube**

Le test en tube ou le test de sensibilité a pour principe d'évaluer et de suivre le niveau de sensibilité ou de résistance des moustiques adultes à un insecticide donné. Ce test permet aussi de comparer l'efficacité des insecticides vis-à-vis d'une espèce de moustique ou la sensibilité de plusieurs espèces de moustiques vis-à-vis d'un insecticide donné. Le but de ce test est: la détermination du nombre de moustiques Kd 50 et Kd 95, l'établissement d'une droite de régression après analyse Log-probit, la possibilité d'avoir aussi les Kd 30 ou Kd 60 et le taux de mortalité après 24h.

### **2-4-7-Autres activités**

Nous avons également participé aux séminaires de formation et de présentation hebdomadaire des travaux de recherches ou des présentations d'articles scientifiques.

### **3-5-Difficultés rencontrées au cours du stage**

Certaines difficultés ont été rencontrées au cours du stage. Il s'agit de: la longue distance entre le lieu de stage et notre lieu d'habitation, et les coupures de courants qui ralentissent souvent les tests ou les manipulations.

### **4-Choix d'un sujet de recherche**

**Evaluation de l'efficacité et de la durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (DuraNet) dans la commune de Ouèssè, Bénin**

#### **4-1-Introduction**

Dans le monde, environ 300 à 500 millions de personnes souffrent du paludisme au cours d'une année, entraînant 1,5 à 2,7 millions de décès par an. Le paludisme continue à peser de façon considérable sur la santé et le développement économique de plus de 100 pays à travers le monde (WHO, 2005). Depuis le début du XXI<sup>e</sup> siècle où les investissements dans la prévention et le traitement du paludisme se sont multipliés, des avancées impressionnantes et décisives ont été notées dans la lutte contre le paludisme. Plus de la moitié (57) des 106 pays où la maladie sévissait en 2000 ont réussi en 2015 à réduire d'au moins 75 % les nouveaux cas de paludisme. Dans le même temps, 18 pays ont obtenu une diminution de 50 à 75 % du nombre de cas de paludisme. Au niveau mondial, la baisse du nombre de cas de paludisme est estimée à 18 %, de 262 millions avec 839 000 cas de décès en 2000 à 214 millions avec 438 000 cas de décès en 2015 (OMS, 2016b).

Depuis Avril 2000, le Bénin s'est engagé à soutenir l'initiative "Roll Back Malaria" (RBM) (PNLP Bénin, 2006). Ainsi, le PNLB dans son plan stratégique de lutte contre le paludisme a mis un accent particulier sur la lutte antivectorielle (LAV) qui repose sur deux interventions primordiales et complémentaires: la couverture universelle des personnes exposées au risque de paludisme en leur facilitant l'accès aux MILDs et campagne de PID<sup>1</sup>. Considérée comme un élément essentiel de la prévention contre le paludisme, la LAV cible les moustiques capables de transmettre les parasites responsables du paludisme (OMS, 2015). C'est ainsi que sur les recommandations de l'OMS, à moins de 2% en 2000, le pourcentage de la population dormant sous une moustiquaire est passé à 55% en 2015. Près de 500 millions de MILDs ont été livrés dans les pays d'Afrique de l'Ouest entre 2013 et 2015 dont 6 077 272 au Bénin en 2014. Le pourcentage de la population ayant accès à une MILD a augmenté pour atteindre 67% en 2015 (PNLP et OMS, 2015). Ces MILDs confèrent aux populations une protection à long terme lorsqu'elle dure dans le temps. Toutefois l'efficacité et la durabilité selon les fabricants ne sont toujours pas vérifiées dans les conditions réelles d'utilisation.

Au regard de ce constat on se demande quels sont les facteurs qui pourraient impacter ces deux indicateurs de qualité et de protection conférées par la MILD. C'est dans ce souci de contrôler la qualité de ces moustiquaires que nous avons initié l'étude portant sur le thème: **Evaluation de l'efficacité et de la durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue**

---

<sup>1</sup>La pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations est un moyen très efficace de réduire rapidement la transmission du paludisme (OMS, 2016).

**durée d'action (MIILD) dans la commune de Ouèssè, Bénin.** De façon spécifique il s'agit de:

(i) apprécier la motivation des communautés à utiliser et estimer la perte des MIILDs dans les ménages,

(ii) suivre le taux d'usure, la bio-efficacité de chacune de ces MIILDs et la dégradation de l'alphacyperméthrine à la surface des MIILDs. Pour atteindre ces objectifs nous avons formulé les hypothèses suivantes: les MIILDs de type DuraNet ont une durée de vie très courte et le taux de chute des insecticides d'imprégnation est élevé.

#### **4-2- Synthèse bibliographique**

Le premier réflexe de l'homme contre la piqûre des moustiques est de se mettre à l'abri de ces insectes. Les moustiquaires assument ainsi pleinement ce rôle. Elles l'assumeront mieux si elles sont imprégnées d'insecticide à effet nocif ou répulsif sur les moustiques. Le concept de moustiquaires imprégnées localement vient ainsi de naître. Pour maintenir leur efficacité, elles doivent être réimprégnées régulièrement (Ministère de la Santé, 2005). La réimprégnation demeure un véritable obstacle. Pour certains, la réimprégnation régulière altère les fibres et comme tout produit chimique, l'insecticide « tue la moustiquaire » ; pour d'autres, l'opération est « encombrante » car les moustiquaires doivent être emmenées dans les centres de réimprégnation et pour beaucoup, le coût de la réimprégnation et la disponibilité des insecticides sont des obstacles majeurs (Djouaka *et al.*, 2003). De tous ces obstacles, découlent un constat dans plusieurs pays africains: moins de 10% des utilisateurs des moustiquaires imprégnées localement, réimprégnent leurs moustiquaires (Pal+/CREC/CPR/CM, 2003). Il devient alors nécessaire sinon pressant de développer un nouveau concept: la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD). Les MIILD sont obtenues par un processus industriel au cours duquel l'insecticide d'imprégnation est incorporé dans les fibres des moustiquaires soit à haute température lors du tissage des fibres polyéthylène (cas des Olyset Net<sup>®</sup>) ou par enrobage à température relativement basse pendant la confection des fibres polyester, c'est le cas des PermaNet<sup>®</sup> (WHOPEST/PermaNet<sup>®</sup>, 2000). On obtient ainsi des moustiquaires dont les fibres contiennent des molécules d'insecticide qui remontent progressivement à la surface des fibres et qui seront graduellement relarguées afin de lutter contre les moustiques adultes (Skovmand, 2001). Les MIILD ont été expérimentés avec succès au Sénégal et en Côte d'Ivoire (Doannio *et al.*, 2003). Leur efficacité est comparable à celle des

moustiquaires imprégnées localement (Doannio *et al.*, 2003) mais leur durée d'efficacité serait de 3 à 4 ans (Ministère de la Santé, 2005). Au niveau communautaire, les MIILD semblent répondre véritablement aux préoccupations des Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Seulement il existe un scepticisme sur les normes d'efficacité et de durabilité des MIILD et des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide en circulation au Bénin.

#### **4-3- Méthodologie**

##### **4-3-1-Situation géographique du site d'étude**

Située en plein cœur du Bénin et au Nord-Est du département des Collines, la Commune de Ouèssè s'étend entre l'Okpara à l'Est et l'Ouémé à l'Ouest sur une superficie d'environ 3 200 km<sup>2</sup>, soit 2,56% de la superficie nationale. La commune compte 14 760 ménages répartis avec une taille moyenne de 6 personnes par ménage (RGPH3, 2002). Elle partage ses frontières au Nord avec la Commune de Tchaourou, au Sud avec les Communes de Savè et de Glazoué, à l'Ouest avec celles de Bantè et de Bassila, et à l'Est avec la République Fédérale du Nigéria. Elle jouit d'un climat tropical intermédiaire entre le climat guinéen et le climat soudanien, avec la tendance ces dernières années vers une saison de culture au lieu de deux par an. La pluviométrie annuelle varie entre 1100 et 1200 mm. La saison sèche qui dure de novembre à mars est marquée par une influence de l'alizé saharien (harmattan) de décembre à février. La commune de Ouèssè se dresse sur une région assez homogène couvrant une pénéplaine modelée sur le matériel précambrien dominée, surtout à l'Est, par des collines granitiques d'environ 300 mètres d'altitude. Elle a un relief peu accidenté qui libère essentiellement des sols ferrugineux tropicaux sur le socle cristallin et des sols colluviaux. On note par ailleurs, essentiellement le long des divers cours d'eau, quelques bas-fonds aux sols hydromorphes propices à la riziculture et au maraîchage. La commune de Ouèssè est une zone forestière par excellence. Elle a une végétation caractérisée par une savane boisée recouverte par un tapis herbacé et parsemé de quelques grands arbres comme le caïlcédrat, le karité, le baobab et le néré (PDC Ouèssè, 2005).



**Figure 3: Carte montrant la commune de Ouèssè (470 x 363.fr.wikipedia.org)**

#### **4-3-2-Type de moustiquaire impliquée dans l'étude**

La campagne de distribution en 2017 permettra de distribuer 6 000 000 de moustiquaires DuraNet sur toute l'étendue du territoire béninoise. Les MIILDs DuraNet sont traitées avec de l'alphacyperméthrine. L'efficacité et la durabilité de ces moustiquaires sera suivie dans la commune de Ouèssè selon les directives de l'OMS (WHO, 2011).

#### **4-3-3-Recensement des ménages et distribution des MIILDs**

Avant la campagne de distribution de 2017, un recensement de l'ensemble des ménages sera réalisé à travers tout le pays, y compris notre site d'étude. Le recensement permettra d'enregistrer le nom du village, le nom du chef de famille, le numéro d'identification du ménage et le nombre d'adultes et d'enfants vivant dans chaque maison (PNLP 2011). La dotation des ménages en moustiquaire sera basée sur la taille du ménage et le ratio d'une moustiquaire pour deux personnes (politique nationale pour la couverture universelle). Cette campagne de distribution permettra de couvrir environ 85% des ménages dans le pays. Les MIILDs distribuées porteront des étiquettes qui permettent de les distinguer de celles distribuées au cours d'autres campagnes ou provenant d'autres sources.

#### **4-3-4-Sélection des ménages et marquage des MIILDs**

Nous aurons à sélectionner les MIILDs DuraNet sur la base des recommandations de l'OMS qui suggère que l'estimation de la taille de l'échantillon doit être basée sur le degré d'usure

minimal des MIILDs dans la région. Dans chaque ménage sélectionné, une moustiquaire DuraNet sera choisie au hasard lorsque plusieurs seraient présentes. La sélection des moustiquaires dans les ménages va prendre en compte le nombre de villages dans la commune de manière à assurer un échantillonnage représentatif de notre site d'étude. Ces moustiquaires sélectionnées seront marquées par une encre indélébile et on disposera d'un GPS pour la reconnaissance de ces ménages après.

#### **4-3-5-Procédure de collecte de données**

Les moustiquaires sélectionnées et marquées seront évaluées suivant les méthodes standards suivantes:

- une enquête de suivi et une observation visuelle pour évaluer les pertes et la détérioration physique des MIILDs;
- Une évaluation de la bio-efficacité par la chromatographie en phase gazeuse (GC). De plus les tests en cône OMS (pour confirmer les résultats des tests chromatographique), en tunnel et en tube seront utilisés pour appréhender la baisse d'efficacité due à la dégradation de la quantité d'insecticide.

#### **4-3-6-Enquête prospective et questionnaire**

Les ménages inclus dans l'étude seront localisés par le nom du chef de ménage et par leurs coordonnées GPS au cours des visites successives. Les ménages qui ne seront pas ouverts pour inspection après deux visites au cours d'une enquête d'évaluation seront revisités lors des enquêtes d'évaluation suivantes. Si le ménage a été trouvé fermé pendant trois enquêtes d'évaluation, il sera écarté de l'échantillon.

#### **4-3-7-Suivi de la présence /absence des moustiquaires marquées dans les ménages**

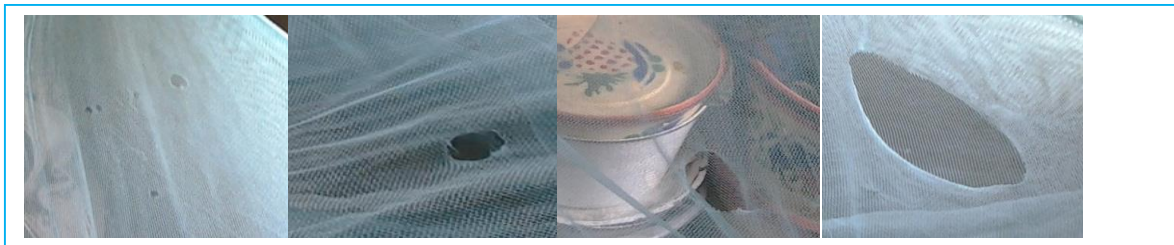
Le taux de suivi lors de la sélection des moustiquaires (To), sera fixé à 100%. Par intervalles de 6 mois, chaque ménage sera visiter pour confirmer la présence ou l'absence de la MIILD marquée. En cas d'absence, le propriétaire sera interrogé. Les raisons qui justifient l'absence de la moustiquaire marquée dans le ménage se répartissent souvent en trois catégories. Il s'agit de (WHO 2011):

- la moustiquaire marquée a été jetée parce qu'elle était physiquement endommagée et jugée non utilisable;
- la moustiquaire marquée a été déplacée (par exemple donnée, volée, vendue, etc.) ;
- la moustiquaire marquée était utilisée à d'autres fins (pêches, jardinage, etc.).

#### **4-3-8--Suivi de l'intégrité physique**

L'intégrité du tissu de la MIILD sera évaluée par un examen visuel. Les trous observés seront affectés à l'une des quatre catégories de taille selon les méthodes décrites par l'OMS (WHO 2011)

- catégorie 1 (Photo 8a): "< pouce (0,5-2 cm)" (impossible d'insérer le pouce) ;
- catégorie 2 (Photo 8b): "> pouce <poing (2-10 cm)" (possible d'insérer le pouce mais pas le poing);
- catégorie 3 (Photo 8c): "> poing < tête < (10-25 cm)" (possible d'insérer le poing mais pas la tête);
- catégorie 4 (Photo 8d): "> tête (> 25 cm) " (possible d'insérer la tête).



**Photo 8: Différentes catégories de trou sur les moustiquaires**

Les causes des trous (simples déchirures, brûlures, défaut de couture) seront aussi recensées pour évaluer la contribution de chacune d'elles à la dégradation physique de la moustiquaire.

#### **4-3-9-Questionnaire d'interview**

Un questionnaire, recommandé par l'OMS (WHO 2011) et adapté aux besoins de notre étude, sera utilisé pour identifier les facteurs associés à la perte de l'intégrité physique et de la bio-efficacité. Les outils qui seront utilisés pour la collecte de données sont des tablettes Samsung Galaxy Tab 10.1 ®. Un formulaire d'enquête électronique sera créé sur ces tablettes grâce au

logiciel de collecte de données ODK (Open Data Kit). Cette technique va permettre l'enregistrement et une mesure instantanée des données. A la fin de chaque visite, les données seront transférées directement à un serveur Cloud en vue d'assurer leur sauvegarde et leur traçabilité.

#### **4-3-10-Evaluation de la bio-efficacité par la Chromatographie gazeuse (GC)**

L'OMS recommande l'utilisation de la méthode bio-essai (test en cône) pour le suivi de la bio-efficacité. Nous avons réalisé les tests en cône, en tube et en tunnel au cours de nos activités, ce que nous avons déjà décrit plus haut.

#### **4-3-11-Analyse de données**

##### **- Taux de survie/Taux de perte des MIILD**

Pour estimer les taux de survie ainsi que les taux de perte des moustiquaires marquées, nous utiliserons les équations suivantes:

Nombre de MIILDs marquées et présentes dans les ménages  
\_\_\_\_\_ x 100

Nombre total de MIILDs marquées à la sélection T0

Pour estimer le taux de perte, nous utiliserons les équations suivantes pour le calcul du taux de perte associés aux différentes raisons pour lesquelles les moustiquaires marquées n'étaient plus présentes dans les ménages:

##### **- Taux de perte-1 : (Raison : dommages physiques)**

Nombre de moustiquaires absentes dans les ménages cause des trous ou déchirures  
\_\_\_\_\_ x 100

Nombre total de MIILD sélectionnées à T0

##### **-Taux de perte-2 : (Raison : déplacement)**

Nombre de moustiquaires données, volées, vendues ailleurs  
\_\_\_\_\_ x 100

Nombre total de MIILD sélectionnées à T0

**- Taux de perte-3 : (Raison : autres utilisations)**

Nombre de moustiquaires utilisées à d'autres activités

$$\frac{\text{Nombre de moustiquaires utilisées à d'autres activités}}{\text{Nombre total de MIILD sélectionnées à To}} \times 100$$

Nombre total de MIILD sélectionnées à To

**L'indice proportionnel de trous (pHI) de chaque moustiquaire**

Le pHI est calculé en faisant la somme de:

- Nombre de trous de catégorie 1  $\times$  1
- Nombre de trous de catégorie 2  $\times$  23
- Nombre de trous de catégorie 3  $\times$  196
- Nombre de trous de catégorie 4  $\times$  576

Ceci permettra d'estimer la valeur approximative de la surface des trous. La formule du pHI se présente alors comme suit :  $pHI = 1 \times \#C1 + 23 \times \#C2 + 196 \times \#C3 + 576 \times \#C4$  (#C=nombre de trous de la catégorie)

Les chiffres 1, 23, 196, et 576 représentent les surfaces moyennes estimées pour chaque catégorie de trous. Nous utiliserons la statistique descriptive pour comparer les pHI obtenus sur chaque site (Moyenne, Médiane, Intervalle interquartile). Sur la base des pHI calculés, chaque moustiquaire sera catégorisée comme suit (Roll Back Malaria, 2012):

- pHI <64: moustiquaire « en bon état »;
- pHI <768: moustiquaire « à réparer »;
- pHI >768: moustiquaire « à remplacer ».

Pour apprécier l'influence des pressions exercées sur les MIILD par les utilisateurs et les facteurs de proximité à un cours d'eau sur l'intégrité physique des MIILD, nous utiliseront la régression Binomiale Négative (McCullagh & Nelder 1989) en prenant le paramètre pHI comme variable d'intérêt. Une analyse de la variance de type III de la régression (Fox &

Weisberg, 2011) permettra d'apprécier la part d'influence de chaque facteur sur le pHI, qui est un paramètre qui résume l'intégrité physique des MIILD.

#### **4-4- Résultats attendus**

Les tests entomologiques nous permettront d'affirmer que l'efficacité des MIILDs diminue et le nombre de résistance de moustiques Kd (effet Knock down) par intervalle de temps est très faible. La mortalité des moustiques 24 heures après leur exposition aux substrats imprégnés d'insecticides par le test en cône révélera que beaucoup de moustiques sont en vie. Le test en tunnel nous permettra la récupération des moustiques dans deux compartiments: femelles vivantes ou mortes, femelles gorgées ou non gorgées pour estimer le taux de passage (pénétration), le taux de gorgement et le taux de mortalité. L'intégrité du tissu de la MIILD nous permettra de dire que les MIILDs DuraNet qu'utilise la population de Ouèssè présentent beaucoup de trous (de type T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>). Elles sont très peu efficaces parce que les insecticides dont elles sont imprégnées n'arrivent pas à tuer les moustiques qui piquent la population de cette localité. La durée de vie des DuraNet est faible. Certaines personnes ne respectent pas les notices d'utilisation de ces moustiquaires en matière de lavage et autres. De plus, les MIILDs utilisées à Ouèssè ne répondent pas correctement aux standards de l'OMS.

#### **5- Conclusions et perspectives**

La présente étude sur les MIILDs utilisées à Ouèssè montre que leur efficacité et leur durabilité est très faible. Ceci a pour origine la provenance de la moustiquaire de même que son fabricant. Le concept MIILD, tel que défini par l'OMS semble connaître des limites quand les moustiquaires sont utilisées et soumises à des pratiques communautaires de lavage. Certains savons traditionnels fortement utilisés dans les communautés accélèrent la dégradation de l'insecticide et écourtent leur efficacité dans le temps. Comme perspectives, nous souhaiterions que le Ministère de la Santé soumette systématiquement tous les échantillons de moustiquaires imprégnées qui entrent au Bénin pour des fins commerciales ou de distribution à un contrôle de qualité. Il est impérieux et judicieux de contrôler la qualité d'autres types de moustiquaires afin de voir ce qui serait efficace et durable pour la communauté béninoise. Le gouvernement béninois doit veiller au contrôle de qualité des différents types de moustiquaires qu'il achète ou reçoit des partenaires sociaux avant toute distribution en recrutant des techniciens compétents pour le contrôle de qualité des moustiquaires. Inviter les fabricants des MIILDs à respecter les normes de durabilité et à produire les moustiquaires de grande taille et à mailles serrées.

## 6-Références

1. Djouaka R., 2003, Doannio J., Toe L., Akogbeto M. : Acceptability of bednets in West African communities. Pal+ Conference proceedings, Anglet, France.
2. Doannio J., 2003, Konan Y., Memain S., Dougrou S., Niangue J., Coulibaly A. : Etude sur l'acceptabilité des MIILD en Côte d'Ivoire. Rapport de l'atelier de Cotonou du 28-29 janvier 2003.
3. Fox, J., S. Weisberg, 2011: An R Companion to Applied Regression. SAGE.
4. Kilian/ RollBack Malaria, February 2012: Measurement of Net Durability in the Field: Current Recommended Methodology, presented in Lyon
5. McCullagh, P., J.A. Nelder, 1989: Generalized Linear Models. Champman and Hall.
6. Ministère de la Santé, 2004: Annuaire des statistiques sanitaires. Bénin, p.82-85.
7. Ministère de la Santé, 2005 : Programme national intégré de lutte contre le paludisme " Un avenir sans paludisme ". Plan stratégique FRP au Rwanda 2005-2010.
8. MR4, 2014: Methods in Anopheles Research.
9. OMS, 2015: Méthodes de lutte antivectorielle de base
10. OMS, 2016: Tendances relatives à la prévalence de l'infection, à l'incidence et à la mortalité liées au paludisme
11. Pal+/CREC/CPR/CM, 2003: Etude sur les représentations sociales et les pratiques liées aux moustiquaires dans les communautés en Afrique de l'Ouest. Rapport, 64 pages.
12. Plan de Développement de la Commune de Ouèssè, 2005
13. PNLP Bénin, 2006: Plan Stratégique de lutte contre le paludisme au Bénin 2006-2010
14. PNLP et OMS, 2015: Résumé du rapport 2015 sur le paludisme au Bénin
15. PNLP, 2011: Evaluation post campagne de la distribution gratuite de MIILDs en 2011 au Benin. Cotonou. Ministère de la Santé.
16. Recensement Général de la Population et de l'Habitat, 2002.
17. Skovmand O., 2001: Development of products with Sustained Released Insecticides. Complex Emergencies conference held in Copenhagen on the 6th-7th December.
18. WHO, 2005: Note d'information stratégique et politique sur la prévention du paludisme au Mali

19. WHO, 2011: Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions
20. WHOPEST/PermaNet®, 2000: Mise à jour sur les moustiquaires durablement imprégnées d'insecticide. RBM, Rapport, 4 pages.

## **Annexes**