

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 STAGE**

**THEME : Corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidja**

Présenté par :

Sêlinnou Geoffroy YAHOUÉ

Sous la supervision de

Professeur Martin AKOGBETO

2<sup>ème</sup> Promotion

**Année académique : 2016-2017**

**C.R.E. - COTONOU**



## Dédicace

**A,**

**Mon père Daniel YAHOUÉ ; ma mère Laurentine AKPOHOUNKE**

Je vous remercie pour votre soutien moral d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui

## Remerciements

Je ne saurais commencer ce mémoire sans reconnaître les contributions diverses qui m'ont permis d'arriver à ce résultat. Ce serait injuste car de nombreuses personnes se sont données tant de peine pour que ce travail voie le jour. Pour que jamais elles ne regrettent d'avoir pris de l'initiative, d'avoir compatié, d'avoir espéré pour moi et avec moi, d'avoir prié et souffert, je me suis décidé à leur adresser quelques mots de reconnaissance. La liste est trop longue mais la pire, c'est de ne rien faire. J'ai alors pensé à remercier quelques-uns de ces expirés incarnant de la peine ; de bienfaisance et d'évolution.

- **Professeur Martin C. AKOGBETO** Coordonnateur de la Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) et Directeur du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). Cher professeur je ne pourrais jamais vous remercier assez, vous m'avez permis d'avoir une formation théorique par votre esprit de créativité en créant la LEBA et de m'avoir donné l'opportunité d'expérimenter mes connaissances théoriques dans votre centre de recherche. Par vos conseils, votre patience et votre amour du travail bien fait, vous avez rendu possible ce mémoire. Daignez trouver ici le témoignage de notre gratitude.
- **Professeur Michel SEZONLIN**, Coordonnateur adjoint de la Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Vos conseils gorgés de substance motivatrice durant l'année universitaire, votre disponibilité à m'écouter ainsi que votre rigueur dans la ponctualité et vos encouragements à mon égard ont été pour moi une grande source de motivation et pour ça, je ne peux que vous remercier infiniment.
- **Docteur Germain Gil PADONOU**, Enseignant chercheur à l'UAC. Votre importance tout au long de cette formation et vos démarches de suivi et de franche collaboration durant mon séjour au CREC ont été capitales. Pour moi vous êtes un modèle de dynamisme et de franche collaboration. Toutes mes reconnaissances à vous Docteur.
- **Docteur Armel DJENONTIN**, Enseignant chercheur à l'UAC. Pour moi, vous êtes un modèle de réussite. Vous m'avez inculqué le savoir-faire et le bien-être à travers vos cours très compréhensibles et en ses mots « l'ordre dans ce que nous faisons paie mille fois que le désordre » en comparant le charbon et le diamant. J'avoue que j'ai été obsédé par l'esprit de travailler avec vous. Je ne saurais jamais vous remercier assez.

- Je tiens aussi à remercier les Chercheurs du CREC : **Razak OSSE, Rock AÏKPON, Rodrigue ANAGONOU, Bangana BIO et Ramzyath AGBANRIN** pour leurs diverses contributions.
- **Mr Hermann W. SAGBOHAN**, Doctorant, Entomologiste Médicale et Vétérinaire à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi (FAST/ UAC). Merci à vous pour votre disponibilité et vos conseils au cours la réalisation de ce mémoire. La gestion d'un homme n'est pas chose facile mais grâce à votre esprit de tranquillité et de patience, vous avez assuré. Avec vous j'ai appris la patience et le sérieux. Je vous remercie infiniment.
- **Mr Ludovic**, sociologue du CREC. Vous avez été comme un frère pour moi aussi bien financièrement que moralement ; je vous avoue toute mes reconnaissances.
- **Mr Idelphonse AHOGNI, Mr KPANOU Casimir, Mr Albert SALAKO, Mr Arsène FASSINOU et Mr Côte Koukpo ZINSOU**, tous doctorants à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi (FAST/ UAC). Vous qui, en dépit de vos multiples occupations aviez accepté apporter vos diverses contributions dans la réalisation de ce travail. Recevez ici mes chaleureuses salutations pour rappeler l'ambiance fraternelle de nos relations.
- **Mr Sidick ABOUBAKAR, Mr Wilfrid SEWADE et Mr Juvénal AHOUANDJINO**U de m'avoir accueilli au laboratoire de biologie moléculaire dans un esprit de partage, de fraternité et d'égalité. J'avoue que sans eux, je pourrai résister aux CREC car, ils m'ont toujours donné beaucoup de courage et l'envie de vouloir connaître à travers les différentes discussions de sur des sujets scientifiques. C'est un honneur de vous connaître cher monsieur.
- **Mr Lazare HOUNKANRIN et Mr Ichiaka ADELODJOU** pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation des travaux à l'insectarium du CREC.
- Je remercie également mes chers oncle **Antoine NONFON et Marcellin NONFON** de pour leur aide financière et conseil très enrichissant.

## **Résumé**

Du fait de leur importance dans la vie de l'homme et leur abondance, l'embranchement des arthropodes mérite une étude approfondir. C'est ce qui a justifié notre formation dont le stage s'est déroulé au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). Cela nous a permis d'appliquer les enseignements théoriques reçus au cours de notre formation dans le différent laboratoire du CREC et de proposer une étude sur la « Corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidja » L'étude sera menée dans le département Zou. Des prospections larvaires seront effectuées sur le terrain, l'élevage des larves à l'insectarium du CREC, puis des manipulations aux laboratoires. On se focalisera surtout sur le statut de la résistance des après et les tests de sensibilités. Après cette étude, Les principaux gènes et mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides sont détectés et une corrélation entre le statut, les gènes et les mécanismes impliqués dans la résistance sera établie.

**Mot clés** : CREC, Entomologie, Paludisme, *Anopheles gambiae*, Résistance, Corrélation

## **Abstract**

Because of their importance in human life and their abundance, the phylum of arthropods merits further study. This justifies our training which took place at the Center of Entomological Research of Cotonou (CREC). This enabled us to apply the theoretical lessons received during our training in the different CREC laboratory and to propose a study on "Correlation with the status and mechanisms involved in the resistance of malaria vectors to insecticides in the communes". Zangnanado, Zakpota and Djidja » The study will be conducted in Zou department. Larval surveys will be carried out in the field, rearing the larvae at the CREC insectarium, and manipulations at the laboratories. We focus mainly on the status of resistance after and sensitivity tests. After the study, the main genes and mechanisms involved in the resistance of malaria vectors to insecticides are detected and a correlation with the status, genes and mechanisms implicit in the resistance will be established.

**Keywords** : CREC, Entomologie, Malaria, *Anopheles gambiae*, Resistance, Correlation

## Liste des sigles et abréviations

**al.** : Collaborateurs

**s. s** : Sensu stricto (sens strict)

**s. l** : Sensu lacto (sens large)

**Ace-I** : Acétylcholinestérase

**Ace-IR** : Acétylcholinestérase Résistant

**An. gambiae** : *Anopheles gambiae*

**Kdr** : knock-down résistance

**AChE** : L'acétylcholinestérase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**CNS** : système nerveuse centrale

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

**DDT** : Dichloro-diphényl-trichloro-éthane

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

**MILD** : Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PID** : Pulvérisation Intra Domiciliaire

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

**UAC** : Université d'Abomey Calavi

**FAST** : Faculté des sciences et technique

**MS** : Ministère de la Santé

**GST** : Glutathion S-Transférase

**FAO** : l'Organisation des Nation uni pour l'Alimentation et l'agriculture

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase

**CDC**: Center for disease control and prevention.

## Table des matières

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Liste des sigles et abréviations.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures .....	xi
Introduction général.....	1
I- Objectifs du stage.....	2
Objectif général.....	2
Objectifs spécifiques.....	2
1- Description du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) et activités menés.....	3
1-1 Cadre physique et le personnel.....	3
1-1 -1 La Direction du CREC.....	3
1-1-2 Le secrétariat du CREC.....	3
1-1-3 Le service administratif et financier du CREC.....	4
1-1-4 Les laboratoires du CREC.....	4
1-1-5 L'insectarium du CREC.....	4
1-1-6 L'animalerie du CREC.....	6
1-1-7Autres personnels du CREC.....	6
1-2- Les thématiques de recherche au CREC.....	7
1-3- Activités menées.....	8
1-3-1 Activité menée sur le terrain.....	8
1-3-2 Activités menées à l'insectarium.....	9
1-3-3Activité menée au laboratoire des tests de sensibilité.....	9
1-3-4 Les activités menées au laboratoire de biologie moléculaire.....	10
1-4 Difficultés rencontrées au cours du stage.....	10
Thème: Corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidj.....	11
Introduction.....	11

<b>Objectif général</b> .....	12
<b>Objectifs spécifiques</b> .....	12
<b>III Synthèses bibliographique</b> .....	13
<b>1 Position systématique et biologie de <i>An. gambiae</i>, vecteur majeur du paludisme</b> .....	13
<b>2 Cycle de développement de l'<i>Anopheles</i></b> .....	13
<b>3 Les différents types de lutte antivectorielle et leur mode d'action</b> .....	15
<b>3-1 La lutte biologique</b> .....	15
<b>3-2 Lutte intégrée</b> .....	15
<b>3-3 La lutte chimique</b> .....	16
<b>4 Les différentes classes d'insecticides et leur mode d'action</b> .....	16
<b>4-1 Les organochlorés</b> .....	17
<b>4-2 Les Organophosphorés</b> .....	17
<b>4-3 Les carbamates</b> .....	18
<b>4-4 Les pyréthrinoïdes</b> .....	18
<b>5 Les mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques</b> .....	18
<b>IV Matériel et méthodes</b> .....	19
<b>1 Présentation de la zone d'étude</b> .....	19
<b>2 Méthodes</b> .....	20
<b>3 Analyse biologique et moléculaire</b> .....	23
<b>4- Résultats attendus</b> .....	23
<b>Conclusion</b> .....	24
<b>Référence bibliographique</b> .....	25

## Sommaire

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>I- Objectifs du stage.....</b>	<b>2</b>
<b>II- Description du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) et activités menés.....</b>	<b>3</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>9</b>
<b>III Synthèses bibliographique.....</b>	<b>11</b>
<b>IV Matériel et méthodes.....</b>	<b>18</b>
<b>V- Résultats attendus.....</b>	<b>22</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>22</b>
<b>Référence bibliographique.....</b>	<b>23</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des travaux à l'insectarium par semaine.....	9
Tableau 2: Les classes d'insecticides recommandés par l'OMS pour la lutte antivectorielle.....	17

## Liste des figures

<b>Figure I</b> : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou.....	3
<b>Figure II</b> : Insectarium du CREC.....	5
<b>Figure III</b> : Animalerie du CREC.....	6
<b>Figure IV</b> : Cycle biologique de l’anophèle.....	14
<b>Figure VI</b> : Carte de la zone d’étude.....	20
<b>Figure VII</b> : Larvarium des moustiques de souches de terrain.....	21
<b>Figure VIII</b> : Insectarium des moustiques de la souche sauvage.....	;22

## Introduction

Les arthropodes constituent le plus important phylum d'animaux tant par le nombre d'individus présents sur terre dans tous les milieux que par la diversité et le nombre d'espèces recensées sur notre planète. Quarante-vingt pourcent (80%) des espèces animales connues sont des arthropodes. On considère actuellement que le seul groupe des arthropodes des tropiques pourrait en réalité être constitué par 30 millions d'espèces au moins, (dont 22 millions d'espèces d'insectes) à savoir 600 fois le nombre d'espèces des vertébrés (Charte sur les invertébrés ; 1986) Conseil de l'Europe - Comité des Ministres ; insecte N° 77). Les arthropodes sont des vecteurs de maladies comme les arboviroses ; la filariose ; les protozooses et les bactérioses etc. Ces pathologies à transmission vectorielle représentent 17% des maladies infectieuses et figurent parmi les plus importantes pathologies en santé humaine, tant par la morbidité que par la mortalité qu'elles entraînent (WHO, 2004). Ces maladies sont principalement répandues dans les régions tropicales où elles sont à la fois les causes et les conséquences de sous-développement ; leur impact en santé publique constitue un frein à l'éducation des enfants et au développement économique des pays (Farenhorst *et al.*, 2010). L'embranchement des arthropodes est subdivisé en plusieurs ordres parmi lesquelles les diptères sont d'une importance capitale du fait de la présence d'espèce particulièrement dangereux pour la santé de l'Homme. Le moustique à lui seul transmet le paludisme, la dengue ; le chikungunya ; le zika ; la fièvre jaune etc... (OMPE, 2017). La *Simulium damnosum* (simulie) et la *glossina palpalis* (glossine) transmettent respectivement, l'onchocercose et la trypanosomiase. L'efficacité de la transmission de ces maladies est liée aux comportements alimentaires des vecteurs (hématophage) et à leur capacité de pouvoir transmettre l'agent à un vertébré (Beaver P., *et al* 1985). Le paludisme touche plus de 400 000 personnes par an. Selon une estimation récente, on compterait 390 millions de cas de dengue par an (intervalle crédible à 95% 284-528 millions), dont 96 millions (67-136 millions) présentent des manifestations cliniques (quelle que soit la gravité de la maladie); 90% des cas de paludisme et 91% des décès dus à cette maladie sont survenus dans les régions d'Afrique (OMS, 2017). En 2016, les financements destinés à combattre et à éliminer le paludisme étaient estimés à 2,7 milliards de dollars. Les contributions des gouvernements des pays d'endémie atteignaient 800 millions de dollars, soit 31% du financement (WHO, 2016). Face à ces dégâts socio-économiques qu'occasionne les arthropodes et les moustiques en particulier, il est d'une grande importance de mener des études sur ces animaux. C'est dans cette perspective qu'à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi (FAST/UAC), il a été créé en 2016 une licence professionnelle intitulée LEBA (Licence en

Evolution ; Biodiversité des Arthropodes et Assainissement). Cette formation a pour but de préparer et de former des jeunes capables de : (i) réaliser des études sur ces animaux (arthropodes), de pouvoir développer des moyens de lutte et de protection contre les arthropodes hématophages (insectes et acariens), vecteurs d'agents pathogènes aux vertébrés et aux végétaux, et leur surveillance ;(ii) répondre à des questions d'ordre environnemental, qui est l'un des facteurs de prolifération de ces organismes nuisibles. Plusieurs instituts et centre de recherches participent conjointement à ces formations et à la surveillance de ces vecteurs de maladies dont l'un d'entre eux est le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC).

Le (CREC) est un établissement public dépendant du Ministère de la Santé béninois et spécialisé dans la recherche sur le paludisme et autres maladies à transmission vectorielles. Ce centre contribue aussi énormément à la formation des cadres entomologistes médicaux nationaux et internationaux. Deux axes de recherche principaux sont développés : l'entomologie chargée de la biologie et caractérisation des vecteurs du paludisme ; étude de la résistance des vecteurs aux insecticides ; évaluation de l'efficacité des insecticides et des moustiquaires imprégnées et la parasitologie clinique chargée des essais cliniques.

Dans le but de renforcer nos connaissances acquises au cours théorique de notre formation et de pouvoir se familiariser avec le monde professionnel, nous avons eu à effectuer un stage de trois mois (04 Décembre aux 04 Mars 2018) dans ce centre (CREC). Au cours de ce stage, nous avons eu à effectuer plusieurs activités. La suite de ce document se portera sur la présentation des objectifs de notre séjour au CREC, la description du centre, les différentes activités menées, les difficultés rencontrées et la présentation d'un projet de recherches portant sur des axes de recherche au CREC :

### **Objectifs du stage**

#### **Objectif général**

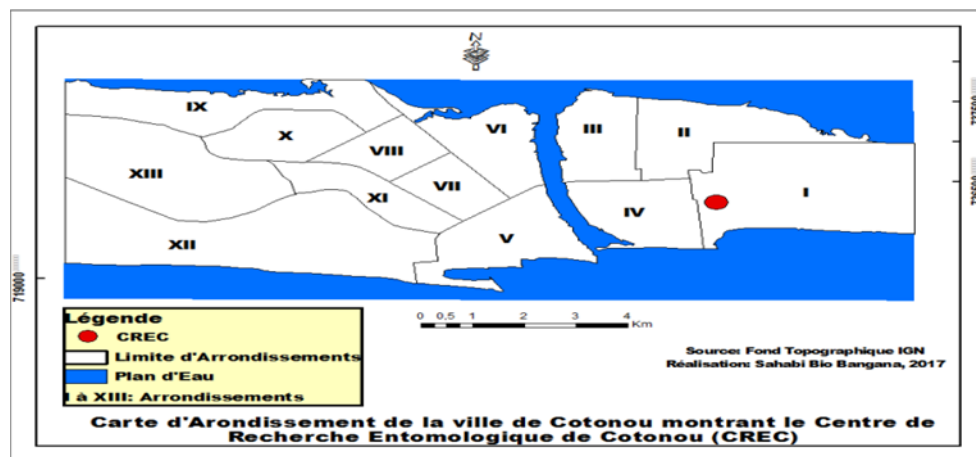
Appliquer les connaissances théoriques en relation avec les activités du CREC et apprendre les habitudes de la vie professionnelle.

#### **Objectifs spécifiques**

- Appréhender les techniques d'étude entomologique sur le terrain et au laboratoire de recherche.
- Développer un projet de recherche sur l'un des axes de recherche du CREC.

## 1-Description du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) et activité menés

Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) est un établissement spécialisé dans la recherche sur les maladies à transmissions vectorielles. C'est un établissement public sous tutelle du Ministère de la Santé, installé dans la même enceinte que le Laboratoire National de Santé Publique. Il est situé dans la zone industrielle de Cotonou, limité au Nord par le Centre National de Télédétection (CENATEL), au Sud par le bâtiment ayant abrité la Centrale d'Achats des Médicaments Essentiels (CAME), à l'Est par la Société Béninoise des Peintures et Colorants (SOBEPEC), à l'Ouest par le service administratif du Ministère de la Santé (MS).



**Figure 1** : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou.

### 1-1 Cadre physique et le personnel

Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) dispose d'une direction, un secrétariat administratif, un service financier, quatre laboratoires d'analyse et de recherche sur les maladies à transmission vectorielle, un insectarium et une animalerie.

#### 1-1-1 La Direction du CREC

Le centre est dirigé par le Professeur Martin AKOGBETO, Coordonnateur de la LEBA, Enseignant à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi (FAST/UAC), chargé de veiller au bon fonctionnement dudit centre. Il élabore des projets de surveillance entomologique en collaboration avec les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) sur tout le territoire béninois. Il dirige et supervise les différentes activités de recherche des étudiants en master et en thèses.

#### 1-1-2 Le secrétariat du CREC

Le secrétariat situé à la direction est assuré par Madame DURAND Clémence et KINDJI Balbine qui sont chargées de la gestion des dossiers administratifs.

### 1-1-3 Le service administratif et financier du CREC

Le CREC dispose également d'un service administratif et financier assuré par Mr Médard YAMADJAKO et assisté par SALIFOU Safiou. Ils sont chargés de la gestion des fonds alloués pour les différentes activités de recherche, du paiement de salaire aux agents du CREC et d'autres questions d'ordre administratifs et financiers.

### 1-1-4 Les laboratoires du CREC

- ✓ Le laboratoire d'entomologie appliquée où se fait l'identification des arthropodes à intérêt médical et des moustiques en particulier. Ce laboratoire est doté du matériel pour l'identification et la dissection des différentes espèces de moustiques et autres insectes diptères (loupes, pinces, une clé de détermination de Gillie et Meillon), d'un microscope pour la lecture de la parité des moustiques. Il est sous la responsabilité du Dr Germain Gil PADONOU, Enseignant- Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) et entomologiste au CREC,
- ✓ Le laboratoire de parasitologie chargé des essais cliniques. Ce laboratoire évalue la chimio-sensibilité du *Plasmodium falciparum* aux anti-malariques et est sous la direction du Dr NAHUM Alain, coordonnateur des projets d'évaluation de la chimio-sensibilité du *Plasmodium falciparum* aux anti-malariques,
- ✓ Le laboratoire de biologie moléculaire où se font les tests moléculaires (PCR) ; des tests de positivité aux antigènes circum-sporozoitique (Elisa CSP) des tests biochimique (Oxydase, Estérase, GST et Acétylcholinestérase) sur les vecteurs du paludisme. Il est sous la responsabilité du Dr OSSE Razacky, Enseignant chercheur à l'université de Kétou. Il assure le bon fonctionnement du laboratoire. Il coordonne la formation des ressortissants étrangers en destination du CREC. Il veille également aux respects des règles d'hygiène au niveau du laboratoire ;
- ✓ Le laboratoire de contrôle de qualité des outils de lutte anti vectorielle. Ce laboratoire est chargé de l'évaluation de l'efficacité des matériaux imprégnés d'insecticides. Il est sous la responsabilité du Mr Idelphonse AHOGNI.

### 1-1-5 L'insectarium du CREC

Il est composé de deux blocs. Le premier bloc appelé lavarium (Figure 1) où sont élevées les larves de différentes souches de moustiques. Ce bloc est constitué de deux compartiments ; A

On y trouve des lampes incandescentes (Fluorescentes), des bacs, des voiles, de la levure, des croquettes de chat, des boîtes de pétrie, de papier filtre etc... pour l'élevage des larves et l'incubation des œufs. Le second bloc communément appelé insectarium (Figure 2) est aussi composé de deux compartiments C et D. On y trouvent des cages, des voiles de cages et de climatiseur pour le réglage de la température (25) et de l'humidité relative. Le compartiment C reçoit les stades adultes des moustiques sauvages (issus du terrain). Quant au compartiment D, il reçoit les cages de moustiques adultes de la souche sensible 'Kisumu et VK-Per'. Ces deux blocs sont sous la responsabilité du Mr Sébastien KOUDENOUKPO assisté dans sa mission par Lazare HOUNKANRIN et Ichiaka ADELODJOU.



**Figure 2** : Insectarium du CREC (Y. Geoffroy)

### 1-1-6 L'animalerie du CREC

L'animalerie s'occupe de l'élevage de petits mammifères (des lapins) et des pigeons sur qui les moustiques se gorgent (prise de sang) pour la maturation de leurs ovaires et la ponte (reproduction des moustiques) est sous la responsabilité de Mr Damien



**Figure 3** : Animalerie du CREC

### 1-1-7 Autres personnels du CREC

On y trouve aussi d'autres chercheurs, enseignants, doctorants et étudiants de master associer pour le bon déroulement des activités menés, des projets pilotés dans ce centre ; il s'agit de

- ✓ Dr AIKPON Rock, enseignant chercheur au centre universitaire de Natitingou et entomologiste au CREC
- ✓ Dr BANGANA BIO Abdoul Sahabi, enseignant chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture(UNA) et environnementaliste au CREC ;
- ✓ Dr ANAGONOU Rodrigue, chercheur entomologiste au CREC ;
- ✓ Dr AGOSSA Rodrigue Fiacre, chercheur entomologiste au CREC ;
- ✓ Dr AGBARIN Ramzyath, chercheur entomologiste au CREC ;
- ✓ Dr BADIROU Kefilath, chercheur entomologiste au CREC ;
- ✓ Dr ATTOLOU Roseline, chercheur entomologiste au CREC ;

- ✓ Doctorants SALAKO Albert, AHOGNI Idelphonse, KOUKPO Come, SAGBOHAN Herman, Casmir et FASSINOUS Arsène qui effectuent des travaux de thèse au CREC et de même que Mr Abou SAIDIKI et Mr Wilfrid SEWADE.

## 1-2 Les thématiques de recherche au CREC

Le CREC travaille actuellement sur plusieurs sujets de recherche dont nous pouvons citer :

- Biologie et caractérisation des vecteurs du paludisme ; étude de la résistance des vecteurs aux insecticides ; évaluation de l'efficacité des insecticides et des moustiquaires imprégnées.
- Inventaire et biologie des Arthropodes d'intérêt forensique à Cotonou.

## 1-3 Activités menées

Au cours de notre stage au CREC, plusieurs activités ont été réalisées aussi bien sur le terrain, à l'insectarium, à l'animalerie et aux laboratoires du Centre.

### 1-3-1 Activités menées sur le terrain

#### ✓ Prospections larvaires

Nous avons réalisé des prospections larvaires dans la commune de DJIDJA, de ZAKPOTA et de ZANDJANNANDO pour la réalisation des tests en tube OMS et en bouteilles CDC. Ainsi, les larves de *An. gambiae* s.l ont été collectées en Décembre 2017 dans différents quartiers de ces communes. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau avec une louche dans des bacs, filtré et conservé dans des cuvettes contenant une quantité raisonnable d'eau de gîte puis acheminées vers l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) pour l'élevage.

### 1-3-2 Activités menées à l'insectarium

#### ✓ Elevage des moustiques

A l'insectarium, on conditionne les larves. Elles sont triées, séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs étiquetés contenant un peu d'eau de gîte et du robinet. 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 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 6h : 00 min du

matin à 6h : 00 min 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.

**Tableau I** : Répartition des travaux de l'insectarium par semaine.

Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche
Récupérer les adultes et/ou les nymphes	Récupérer les adultes et/ou les nymphes	Récupérer les adultes et/ou les nymphes	Récupérer les adultes et/ou les nymphes	Récupérer les adultes et/ou les nymphes	Récupérer les adultes et/ou les nymphes	Récupérer les adultes et/ou les nymphes
Nourrir les larves	Nourrir les larves	Nourrir les larves	Nourrir les larves	Nourrir les larves	Nourrir les larves	Nourrir les larves
Changer le jus dans les cages	Changer le jus dans les cages	Changer le jus dans les cages	Changer le jus dans les cages	Changer le jus dans les cages	Changer le jus dans les cages	Changer le jus dans les cages
Gorger les femelles en reproduction		Gorger les femelles en reproduction		Gorger les femelles en reproduction		
	Mettre les pondoirs	Mettre les pondoirs	Mettre les pondoirs	Mettre les pondoirs		

### 1-3-3 Activités menées au laboratoire des tests de sensibilité

#### ✓ Test de sensibilité en tube OMS.

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiés comme *A. gambiae s.l.* ont été exposés à des doses diagnostiques de divers insecticides pour les tests de sensibilité en utilisant les papiers imprégnés d'insecticides comme le décrit le protocole standard des tests OMS (OMS, 2014), ou en utilisant des flacons d'insecticides comme le décrit le protocole des tests en bouteilles CDC.

#### ✓ Test de sensibilité en bouteilles CDC.

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiés comme *A. gambiae s.l.* ont été exposés à des doses diagnostiques de divers insecticides pour les tests de sensibilité en utilisant des flacons d'insecticides comme le décrit le protocole des tests en bouteilles CDC.

### 1-3-4 Les activités menées au laboratoire de biologie moléculaire

#### ✓ Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Les moustiques morts et vivants issus des tests de sensibilité sont soumis aux tests de biologie moléculaire en fonction des objectifs. La PCR nécessitent différentes étapes dont l'extraction de l'ADN, l'amplification et la révélation des produits amplifiés sur gel. Les mutations *Kdr* Leu-Phe et *Ace-IR* G119S sont déterminées puis la fréquence allélique des deux mutations (*Kdr* et *Ace-IR*) au sein de ces moustiques sont calculée.

#### ✓ Le dosage enzymatique

L'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des insectes et qui sont à la base de la résistance métabolique.

### 1-4 Difficultés rencontrées au cours du stage

- Difficulté financière ; ces difficultés sont liées aux moyens de déplacement qui se justifie par la distance qui sépare la maison et le centre de recherche.
- les difficultés liées aux coupures d'électricité imprévisible qui provoque la perte d'échantillon ou altère la qualité de produit obtenir après la manipulation.

**THEME-** Corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidja

## Introduction

Parmi ces arthropodes, les moustiques sont les plus redoutables, tant par leur abondance que par les maladies qu'ils transmettent. Beaucoup d'agents pathogènes utilisent le moustique comme vecteur et l'homme comme hôte pour la réalisation de leur cycle biologique. Il s'agit des virus, des bactéries, des protozoaires parasites. Ils sont vecteurs du paludisme, des filarioses lymphatiques et des arboviroses (Coosemans & Van Gompel, 1998). De toutes les grandes endémies tropicales, le paludisme est l'une des maladies dont les répercussions sur la mortalité infantile et l'économie sont les plus graves (WHO, 2014). Le paludisme est une parasitose due à des moustiques du genre *Anopheles*. C'est une maladie fébrile, hémolysante, qui constitue un fléau mondial. L'agent pathogène de cette maladie a été découvert dans le sang en 1880 par Laveran à Constantine (Laveran *et al.*, 1881). Marchiafava, Celli et Golgi ont distingué trois espèces parasites de l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*. Une quatrième espèce plasmodiale, *P. Ovale*, est isolée en 1922 par Stephens (Diakité *et al.*, 2008). Il est important de signaler qu'une cinquième espèce de parasite humain, *Plasmodium knowlesi* a été identifiée en Asie (Figtree *et al.*, 2010). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette affection continue à peser de façon considérable sur la santé et le développement économique des pays de l'Afrique au sud du Sahara (WHO, 2014). Malgré les efforts nationaux et internationaux, le paludisme reste un problème de santé publique majeure (WHO 2014). La lutte antivectorielle représente le principal moyen mis en œuvre pour le contrôle de la transmission du paludisme. La pulvérisation intra domiciliaire (PID) et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILD) sont en ce moment les deux principales méthodes de lutte contre les vecteurs (WHO, 2013). Il est à remarquer malheureusement que la performance des traitements à insecticides dans la lutte contre les vecteurs du paludisme est confrontée à un sérieux problème : la résistance des vecteurs aux insecticides.

Au Bénin, la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes observée d'abord à Cotonou s'est étendue dans les régions méridionale et centrale du pays, mais aussi dans les localités de la région septentrionale (Akogbéto *et al.*, 1999 ; Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouléton *et al.*, 2010). La résistance des vecteurs aux insecticides est principalement due à deux principaux phénomènes chez les anophèles : une mutation génétique de cible, la mutation *Kdr* (Martinez-Torres *et al.*, 1998) et une augmentation des processus enzymatiques de détoxification (oxydases, estérases, etc.) (Vulule *et al.* 1999). En Afrique de l'Ouest, les travaux de Fanello *et al.* (2003) et de Weill *et al.* (2004) ont montré la présence de la mutation *Kdr* seulement chez la forme moléculaire S (*An. gambiae* s.s) d'*An. Gambiae* s.l. Au Benin et au Burkina Faso, la mutation a été détectée aussi bien chez la forme moléculaire S (*An. gambiae* s.s) que chez la forme M (*An. colluzii*) d'*An.*

*gambiae* s.l. avec une fréquence allélique très élevée (Djogbénu *et al.*, 2008 ; Djèntonin *et al.*, 2010 ; Dabiré *et al.*, 2008). En 2015, l’OMS publia que 60 pays au total ont signalé une résistance à au moins une classe d’insecticides et que 49 de ces pays indique une résistance à deux classes ou plus. Ainsi, pour palier à ce phénomène de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, le Bénin à l’instar de 14 autres pays africains, a intégré depuis 2008 la pulvérisation intra domiciliaire (PID) dans les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme. Cependant, toutes les stratégies de contrôle des vecteurs basées sur l’utilisation d’insecticides nécessitent une connaissance approfondie des mécanismes de résistance vis-à-vis des insecticides utilisés et de leur niveau de résistance dans les populations naturelles. Pour cela, le statut de résistance des vecteurs de paludismes (moustiques) aux insecticides est détecté en Afrique suivant deux méthodes : le protocole de l’Organisation Mondiale de la Santé à travers les tests en tubes OMS et le protocole du Centre de contrôle des maladies (CDC) à travers les tests en bouteilles CDC. C’est pour essayer de voir la relation qui pouvait exister entre les résultats obtenues après la réalisation des deux tests sur une même population de moustique que le sujet de notre mémoire porte sur « **Corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidja** ».

### **Objectif général**

Etudier la corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidja.

### **Objectifs spécifiques**

- ✓ Etudier la sensibilité de *Anophèles gambiae* s.l à la deltaméthrine (0,05%), la perméthrine (0,75%), le DDT (4%) le bendiocarb (0,1%) et le pirimiphos méthyl 0,25%.
- ✓ Rechercher les différents mécanismes de résistance d’*Anophèles gambiae* aux insecticides
- ✓ Etablir la corrélation qui existe entre le statut et les mécanismes impliqués

## **2-1 Synthèses bibliographique**

### **2-1-1 Position systématique et biologie d’*An. gambiae*, vecteur majeur du paludisme.**

La position systématique d’*An. gambiae* s.l. d’après Gillies et Coetzee (1987) est la suivante :

**Règne :** Animal

**Embranchement :** Arthropodes

**Classe :** Insectes

**Sous-classe :** Ptérygotes

**Section :** Oligonéoptères

**Sous-section :** Mécoptéroïdes

**Ordre :** Diptères

**Sous-ordre :** Nématocères

**Famille :** Culicidés

**Sous-famille :** Anophélinés

**Genre :** *Anopheles*

**Sous-genre :** *Cellia*

**Série :** Pyretophorus

**Espèce :** *Anopheles gambiae* s.l

### **2-1-2 Cycle de développement de l'*Anopheles***

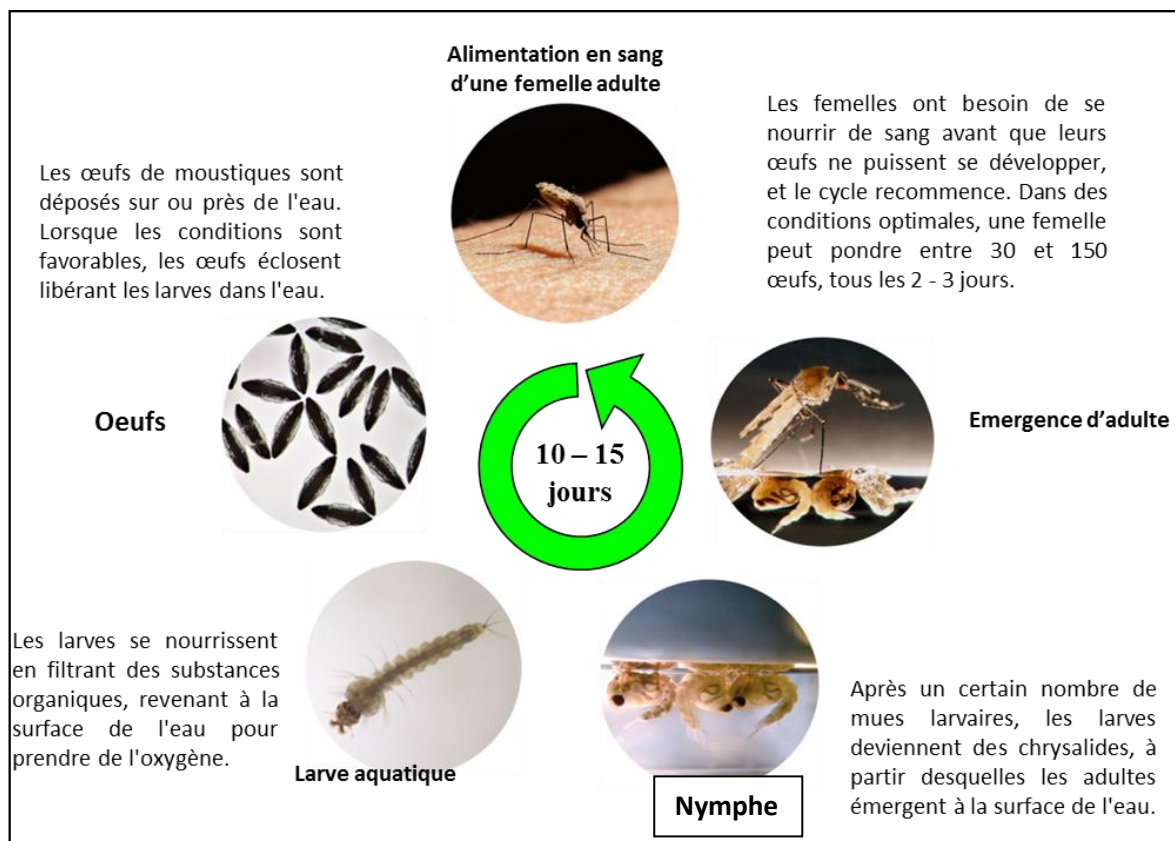
Les Anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement (figure IV) comporte deux phases (Mouchet et Carnevale, 1991) :

- la première est aquatique et concerne les stades pré-imaginaux (œuf, larve, nymphe);
- la seconde est aérienne et concerne l'adulte ou imago.

La femelle pond les œufs isolément à la surface de l'eau. Ces œufs de forme plus ou moins ovoïde, sont pourvus latéralement de flotteurs, leur permettant de conserver une position horizontale. Après 1 à 3 jours, l'œuf éclot donnant une larve qui mesure à peine un millimètre, mais elle subit trois mues consécutives qui, par les modifications morphologiques qu'elles entraînent, la conduisent au quatrième stade ou larve adulte. La durée du stade larvaire est très variable peut aller de six à vingt-quatre jours à la fin duquel survient la mue nymphale. Le stade nymphal dur souvent moins de 48 heures, et l'adulte émerge au terme de ce stade. La durée de développement des stades pré-imaginaux varie de 8 à 12 jours suivant les espèces et les conditions du milieu.

Après l'émergence, les femelles se reposent de 12 à 24 heures et les mâles pendant 3 jours pour que leur exosquelette se durcisse et que les organes reproducteurs se mettent en place. Après le troisième jour de leur vie imaginale, les mâles essaient au crépuscule, puis s'accouplent avec des femelles âgées de un à deux jours. Les femelles ont besoin des protéines contenues dans le sang prélevé pour assurer le développement de leurs ovaires. La durée du cycle trophogonique est

de l'ordre de 3 à 4 jours pour le premier cycle qui comporte une phase prégravidе facultative, et de 2 à 3 jours pour les cycles suivants qui ne nécessitent qu'un seul repas de sang (Holstein, 1949). La durée moyenne de vie des adultes varie de 3 à 4 semaines selon les espèces et les conditions climatiques.



**Figure 4** : Cycle biologique de l'anophèle (Mouchet et Carnevale, 1991)

### 2-1-3 Les différents types de lutte antivectorielle et leur mode d'action

Il existe différent type de lutte anti vectorielle capable d'agir à tous les différents stades du cycle de développement de ces animaux.

#### 2-1-3-1 La lutte biologique

La lutte biologique utilise exclusivement des substances naturelles d'origine animale ou végétale ou même le vivant en entier. Elle se pratique en grande partie au stade larvaire de l'animal. Ainsi, on trouve des poissons lavivores et l'utilisation de bactérie *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). La *Bti* a la capacité de synthétiser des inclusions cristallines associées aux spores ayant des propriétés insecticides. Elles sont formées de protéines variées appelées toxines Cry (Bravo et al., 2011). Une fois ingérées par les larves des insectes, les protoxines contenues dans les inclusions

sont solubilisées par les protéases de l'intestin moyen, libérant ainsi les  $\delta$ -endotoxines. Ces protéines toxiques vont ensuite se lier aux récepteurs cadherin-like situés à la surface des microvillosités des cellules épithéliales et subir une protéolyse. Cette étape va permettre l'oligomérisation des protéines toxiques puis la liaison avec d'autres types de récepteurs (GPI anchored receptor) et enfin l'insertion dans la membrane des cellules épithéliales pour former des pores. Cette étape va induire un choc osmotique au niveau de l'intestin moyen et favoriser la germination des spores. *Bti* va alors se multiplier et se répandre dans l'organisme provoquant la mort de l'insecte par septicémie (Nielsen-LeRoux et al., 2012).

Quant aux poissons lavivores, plusieurs espèces dont *Poecilia reticulata* (guppy) est l'un des plus utilisés au monde. Il existe également des insectes aquatiques prédateurs de larves de moustique se telle que toxorynchites (diptère), le diptique (coléoptère), les larves de libellules (odonate), de nèpes, les notonectes et les ranatres (hétéroptère) (Frédéric D., 1998).

### **2-1-3-2 Lutte intégrée**

Selon l'Organisation des Nation uni pour L'Alimentation et l'agriculture (FAO), la lutte intégrée est définit comme un système de gestion des populations d'organismes nuisibles, en fonction de critères économiques, par l'intégration et non la juxtaposition de toutes les techniques connues aux facteurs naturels de régulation (FAO, 1968.). La lutte contre des maladies à vecteurs est très rarement obtenu par une approche unique, que ce soit la lutte contre les vecteurs, la lutte contre les agents pathogènes ou le contrôle des réservoirs, seule une approche intégrée est réaliste (Didier Fontenile., 2008). Ainsi, en entomologie médicale on utilise en combinaison avec d'autre organisme vivant en combinaison avec les produits phytosanitaires (insecticide).

### **2-1-3-3 La lutte chimique**

La lutte chimique peut être pratiquée de façon individuelle ou collective. Au niveau individuel, il passe par l'utilisation d'un bon nombre de produit phytosanitaire soit imprégné sur un support (moustiquaire imprégné d'insecticide) ou volatile (sympentin ; bombe aérosol etc.). Les deux mesures de lutte antivectorielle de base largement applicables sont les moustiquaires à imprégnation durable (MID) et la pulvérisation intra domiciliaire (PID). Entre 2000 et 2015, plus d'un milliard de moustiquaires imprégnées ont été livrées dans les pays d'endémie palustre. En Afrique subsaharienne, où le paludisme touche surtout les enfants de moins de cinq ans, la proportion d'enfants dans cette tranche d'âge qui dorment sous une moustiquaire est passée de 2

% en 2000 à 68 % environ en 2015. L'augmentation rapide du nombre de moustiquaires imprégnées est, de loin, le facteur qui a contribué le plus à la chute impressionnante de l'incidence du paludisme, ce qui montre que ces moustiquaires permettent de réduire efficacement voire d'interrompre la transmission du paludisme lorsque la population y a largement accès et les utilise. La pulvérisation intra domiciliaire consiste à pulvériser avec une dose efficace d'insecticide à effet rémanent prolongé, en général une ou deux fois par an. L'insecticide est pulvérisé sur les surfaces intérieures des murs et sur les plafonds où les vecteurs du paludisme sont susceptibles de se poser après leur repas sanguin. Pour que la communauté soit efficacement protégée, le niveau de couverture doit être élevé et la PID doit rester efficace pendant toute la saison ou toutes les saisons de transmission du paludisme. On estime que 116 millions de personnes (soit 4 % de la population à risque dans le monde) étaient protégées par cette méthode en 2014 (OMS., 2015). L'application de ces méthodes nécessite une connaissance bien fondée sur les différentes classes d'insecticides que l'on utilise en lutte antivectorielle et leur mode d'action.

#### 2-1-4 Les différentes classes d'insecticides et leur mode d'action

Il existe trois(03) classes d'insecticides recommandés par l'OMS pour la lutte antivectorielle: les organochlorés, les Organophosphorés, les Carbamates et les Pyréthriinoïdes.

**Tableau II** : Les classes d'insecticides recommandés par l'OMS pour la lutte antivectorielle

Classes d'insecticides	Insecticides	Concentration discriminante (période d'exposition de 1heur)
Organochlorés	DDT	4%
	Dieldrine	4%
Organophosphates	Malathion	5%
	Fénitrothion	1%
	Primiphos-méthyle	0,25%
Carbamates	Propoxur	0,1%
	Bendiocarb	0,1%
	Carbasulfan	0,4%
Pyréthriinoïdes	Perméthrine	0,75%
	Deltaméthrine	0,05%
	Lambdacyhalothrine	0,05%
	Cyfluthrine	0,15%
	Etofenprox	0,5%
	Alpha-cyperméthrine	0,05%
	Bifentrine	0,2%

#### **2-1-4-1 Les organochlorés**

Cette famille est subdivisée en 3 sous-familles selon le mode d'action et la structure chimique des molécules. Il s'agit du DDT et ses analogues, du lindane et des cyclodiènes. Le DDT découvert en 1939 constitua une véritable révolution dans la lutte contre les insectes. Cette molécule fut largement utilisée en agriculture et en santé publique. En santé publique, le DDT a permis de sauver des millions de vies humaines (Mouchet, 1994). Le DDT agit sur le système nerveux périphérique et central des insectes. L'action de cet insecticide est rapide et se traduit par un effet de choc (knock-down) réversible aux doses sub-létales. Chez les insectes, le DDT et les pyréthriinoïdes provoquent des mouvements convulsifs, la paralysie puis la mort. Au niveau moléculaire, ces insecticides se fixent préférentiellement sur le canal sodium ouvert. Cette liaison ralentit la fermeture du canal conservant ainsi le passage d'ions  $\text{Na}^+$  à travers la membrane. (Davies et al. 2007). Le DDT a été abandonné à cause de son accumulation dans les chaînes alimentaires et de l'apparition de la résistance.

#### **2-1-4-2 Les Organophosphorés**

Ce sont des dérivés de l'acide phosphorique ou de l'acide thio-phosphorique. Moins toxiques que les organochlorés, ils les ont progressivement remplacés à partir des années 1950. Les organophosphorés les plus utilisés sont le malathion, le fénitrothion et le Pirimiphos-méthyl comme larvicides ou imagocides en aspersions intra-domiciliaires. L'acétylcholinestérase est la cible des organophosphorés. Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine pour stopper la transmission synaptique et réguler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique. L'acétylcholine réagit avec les sites actifs de l'acétylcholinestérase (site anionique et la triade catalytique: Ser-His-Glu) et subit une hydrolyse. La choline est ainsi libérée et un intermédiaire "acétyl-enzyme" est formé (Soreq et Seidman, 2001). Lorsque la concentration de l'acétylcholine devient trop forte, les récepteurs cholinergiques se bloquent en position ouverte induisant la paralysie puis la mort de l'insecte.

#### **2-1-4-3 Les carbamates**

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'acide carbamique. Ces composés sont moins toxiques que les précédents. Comme les organophosphorés, ils inhibent l'AChE ; Le mode d'action des carbamates sur le site actif de l'acétylcholinestérase est similaire. Dans ce cas, la réaction sur le résidu sérine est une carbamoylation qui libère une forme carbarylenzyme inactive. Il empêche l'hydrolyse de l'acétylcholinestérase mais cette étape est réversible. L'inhibition de

l'acétylcholinestérase est donc plus faible dans le cas des carbamates. Le Bendiocabe appartient à cette famille (Fony louat , 2013).

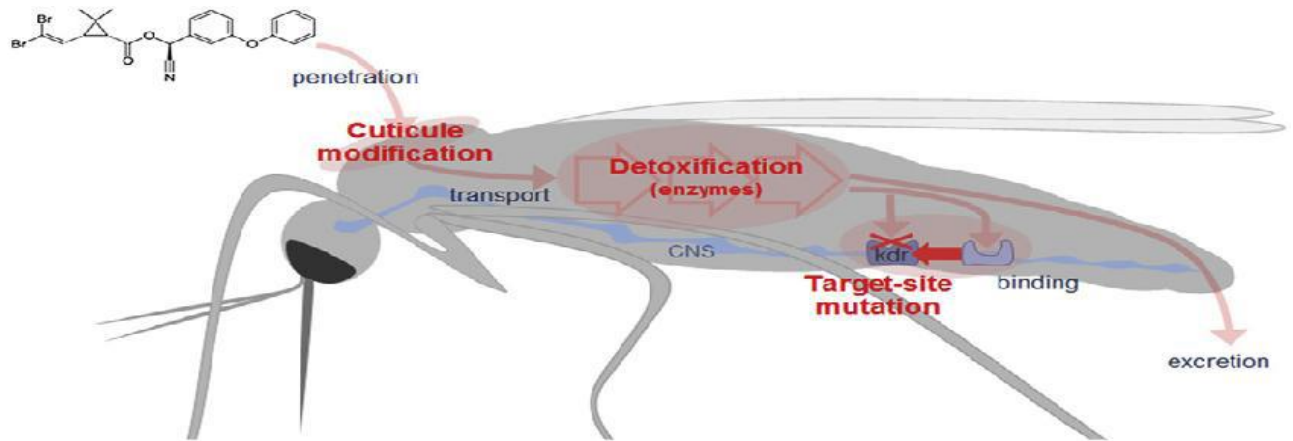
#### **2-1-4-4 Les pyréthrinoïdes**

Selon leur origine, les pyréthrinoïdes ont été classés en pyréthrinoïdes naturelles ou insecticides botaniques extraites des plantes (Solanaceae, Compositaceae) et en pyréthrinoïdes synthétiques (*Ca* boxylester). Les pyréthrinoïdes ont la même cible que le DDT et induisent rapidement un effet knock-down. Ils possèdent des propriétés excito-répulsives et sont peu toxiques pour les mammifères aux doses opérationnelles). Il sont utilisé dans l'imprégnation des moustiquaires à cause de leur effet irritant marqué sur les moustiques (Chandre *et al.*, 1999). Les plus utilisés sont : la perméthrine, la deltaméthrine, la lambdacyalothrine, l'alphacyperméthrine et la cyfluthrine.

L'utilisation de ces différent méthodes en particulier la lutte chimique confère une capacité d'adaptation à une population cible. Il est donc important de surveiller la résistance dans une population donné.

#### **2-1-5 Les mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques**

Il existe actuellement trois types de mécanismes de résistance : la résistance biochimique (enzymes), la résistance cubculaire (figure : 5) et la résistance comportementale (évitement). Trois termes sont employés pour décrire les patrons de résistance des insectes aux substances chimiques : résistance simple, résistance croisée, résistance multiple et résistance multiplicative (Nikou *et al.* 2003). On parle de résistance simple lorsqu'un mécanisme de résistance permet à l'insecte de résister à une classe d'insecticide donnée. Quant à la résistance croisée, le mécanisme de résistance qui permet aux insectes de résister à un insecticide, peut aussi conférer la résistance à un autre insecticide. Un tel phénomène s'observe généralement entre des insecticides de classes différentes mais ayant le même site d'action. Par exemple, les organophosphorés et les carbamates ont des cibles et des modes d'actions relativement similaires et la résistance à une famille entraîne souvent celle de l'autre. La résistance croisée désigne également la résistance a plusieurs insecticides avec des modes d'action différents mais qui sont métabolisés par les mêmes enzymes (isozymes) (Lepoivre, 2003). La résistance multiple est la résistance conférée par plusieurs mécanismes de résistances chez un insecte. A titre illustratif, un insecte possédant des gènes mutés distincts qui le rendent résistant a deux familles d'insecticides avec des modes d'action différents (Perera *et al.* 2008). Enfin, la résistance multiplicative désigne le fait que plusieurs mécanismes de résistance confèrent le statut de résistance à l'insecte (Hardstone *et al.* 2009). Autrement dit, les mécanismes de résistances peuvent agir en synergie.

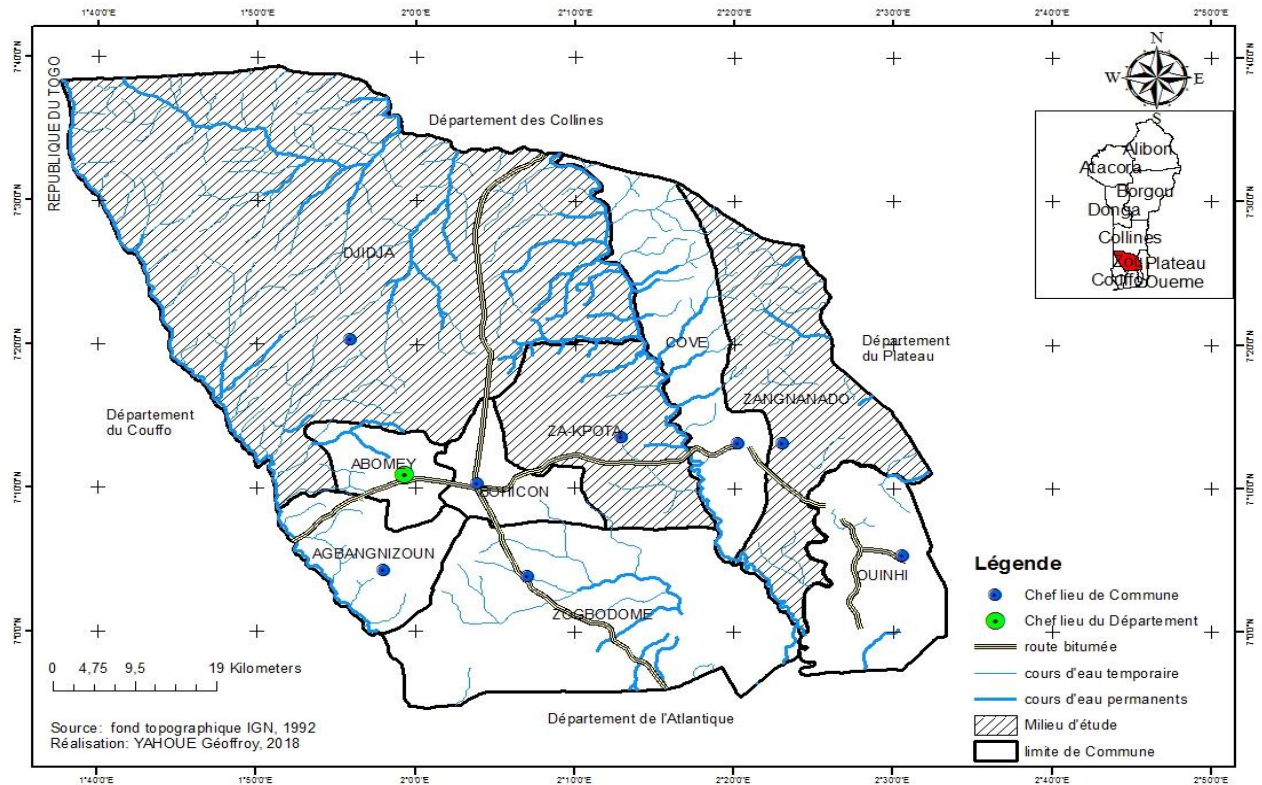


**Figure 5** : Les mécanismes biochimiques (détoxification des enzymes et mutations de cible) et cuticulaire de résistance à la deltaméthrine. CNS signifie le système nerveux central (Nkya *et al.* 2013).

## 2-2 Matériel et méthodes

### 2-2-1 Présentation de la zone d'étude

L'étude sera menée dans trois communes (DJIDJA, de ZAKPOTA et ZANDJANNANDO) du département du Zou (Figure VI) qui est un département du Bénin en Afrique de l'Ouest. Il compte 599 954 habitants sur une superficie de 5 667 km<sup>2</sup>. La densité de population du Département de Zou est donc de 105,9 habitants par km<sup>2</sup>. Bohicon, Zakpota et Djidja sont les plus grandes villes du Département parmi les 9 villes qui le compose. Le Climat de savane avec hiver sec est le climat principal qui le caractérise. Il est limité au Nord par le département des Collines, au Sud par les départements de l'Atlantique et de l'Ouémé, à l'Est par le département du Plateau, à l'Ouest par le Couffo et la République du Togo. La moyenne pluviométrique annuelle varie entre 900 mm et 1 200 mm d'eau. La période de croissance végétative varie entre 80 jours et 100 jours. Dans le Zou, il y a deux saisons de pluies (Mars à Juillet) et de (Août à Octobre). Le calendrier agricole suit le régime des pluies.



**Figure 6 :** Carte de la zone d'étude

## 2-2-2 Méthodes

### ✓ Collecte des larves

Nous avons réalisé des prospections larvaires dans la commune de DJIDJA, de ZAKPOTA et de ZANDJANNANDO pour la réalisation de test OMS en tube. De tels tests exigent des spécimens de moustiques âgés de 2 à 5 jours qu'on ne peut obtenir qu'à partir des larves. Ainsi, les larves d'*An. gambiae* s.l ont été collectées en Décembre 2017 dans différents quartiers. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau avec une louche dans des bacs, filtré et conserver dans des cuvettes contenant une quantité raisonnable d'eau de gîte puis acheminées vers l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) pour l'élevage.



**Figure 7:** Larvarium des moustiques de souches de terrain

### ✓ Elevage des moustiques

A l'insectarium, on conditionne les larves. Elles sont triées, séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs étiquetés contenant un peu d'eau de gîte et du robinet. 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 6h : 00 min du matin à 6h : 00 min 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. Les adultes issus de l'émergence des larves collectées sur le terrain et mis en cage sont nourris au jus de miel (10%). Les femelles adultes de 2 à 5 jours sont isolées pour être soumises aux tests de sensibilité/résistance aux différents insecticides.



**Figure 8** : Insectarium des moustiques de la souche sauvage

✓ **Test de sensibilité en tube OMS.**

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiés comme *A. gambiae s.l.* ont été exposés à des doses diagnostiques de divers insecticides pour les tests de sensibilité en utilisant les papiers imprégnés d'insecticides comme le décrit le protocole standard des tests OMS (OMS, 2014). Les insecticides suivants ont été testés : la deltaméthrine (0,05%), la perméthrine (0,75%), le DDT (4%) le bendiocarbe (0,1%) et le pirimiphos méthyl 0,25%. Pour chaque insecticide testé, 20 à 25 moustiques femelles sont transférés dans 4 tubes en plastique marqué en vert (tubes d'attente ou tubes d'observation) et dans deux autres tubes marqué en vert (tube témoin). Ces tubes verts contiennent chacun un papier non imprégné d'insecticide (feuille blanche normale) de dimension 12 X 15cm fixé par deux clips métalliques argentées. Les tubes marqués rouges (tubes tests) contiennent quant à eux des papiers imprégnés d'insecticide fixés aux parois des tubes rouges grâce à des clips métalliques de bronze. Chaque tube rouge est ensuite fixé aux plaques coulissantes où sont fixés les tubes marqués vert (tubes d'attente). Après ouverture des plaques coulissantes les moustiques contenus dans les 4 tubes d'observation ou tubes d'attente sont transférés délicatement dans les 4 tubes tests (tubes marqués rouges). Les tubes tests sont laissés en position verticale sur la table de manipulation pendant toute la durée d'exposition (1 heure) et le nombre de moustiques femelles Knock down, tombés sur le dos sous l'effet choc de l'insecticide (Organochlorés, Pyréthriinoïdes) ou mort (Carbamates, Organophosphorés) au bout de 0, 15, 30, 45, 60 minutes d'exposition sont enregistrés. Après 1 heure d'exposition, les moustiques contenus dans les tube tests sont retransférés délicatement dans les tubes

d'observation et sont laissés pendant 24 heures avec un coton imbibé de jus sucré dans de meilleures conditions de température (25+/- 2°C) et d'hygrométrie (80% +/- 10%).

### ✓ **Interprétation des résultats**

La mortalité au bout de 24 heures a été déterminée selon le protocole de l'OMS. Le taux de mortalité est déterminé en additionnant le nombre de moustique mort dans les quatre répliques du test d'exposition divisé par le nombre total de moustique exposés à l'insecticide le tout multiplié par cent :

$$\text{Taux de mortalité} = \frac{\text{nombre total de moustique morts}}{\text{nombre total de moustique testé}} \times 100$$

Les moustiques morts et vivant sont récupéré pour les tests moléculaires dans le but de la détermination des différentes espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l (PCR-espèce) d'une part et pour la détermination des mécanismes de résistance (PCR-*Kdr* et PCR-*Ace-IR* ; le dosage des enzymes de détoxification : les mono-oxygénases à cytochrome P450, Estérase et glutathions S-transférases) d'autre part.

## 2-2-3 Analyse biologique et moléculaire

### ✓ **Réaction en chaîne par polymérase (PCR)**

Les moustiques morts et vivants issus des tests de sensibilité sont soumis aux tests de biologie moléculaire en fonction des objectifs. Les femelles d'anophèles sont analysées à la PCR selon le protocole de Scott *et al.* (1993) pour la détermination des différentes espèces du complexe *An. gambiae* s.l, puis selon le protocole de Favia *et al.* (1997) pour l'identification des différentes formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. Les mutations *Kdr* Leu-Phe et *Ace-IR* G119S sont déterminées respectivement suivant les protocoles de Martinez *et al.* (1998) et de Weill *et al.* (2004). Après le génotypage de ces moustiques, la fréquence allélique des deux mutations (*Kdr* et *Ace-IR*) au sein des moustiques sont calculée.

### ✓ **Le dosage enzymatique**

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

## 7-5 Résultats attendus

**Au terme de notre étude, les résultats suivants sont obtenus :**

- ✓ Le statut de résistance d'*Anopheles gambiae* s.l dans le département du Zou, plus précisément dans les communes de Zakpota, Zangnando et Djidja sont connus ;
- ✓ Les principaux gènes et mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides sont détectés ;
- ✓ Une corrélation entre le statut, les gènes et les mécanismes impliqués dans la résistance est établie.

## Conclusion

Le stage effectué au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) a été très enrichissant. Mes attentes ont été largement comblées. Le contact avec le monde de la recherche m'a permis d'approfondir mes connaissances sur plusieurs thématiques, notamment sur le thème de la résistance des vecteurs aux insecticides. Corrélation entre le statut et les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes de Zangnanado, Zakpota et Djidja contribuerait à une meilleure connaissance des vecteur de paludisme dans le departement du ZOU afin de mieux gérer la résistance des vecteurs aux insecticides. Les campagnes de lutte antivectorielle pourrions alors contribuer efficacement à une baisse de la densité et de la longévité des vecteurs et par conséquent avec une diminution du nombre de malade.

## Référence bibliographique

- 1- BEAVER P. C., JUNG R. C., 1985 - *Animal Agents and Vectors of Human Disease*. Philadelphia: Lea & Febiger, 281 p.
- 2- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S and Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2011) 41, 423–431 p.
- 3- Charte sur les invertébrés ; 1986 : Conseil de l'Europe - Comité des Ministres ;( insecte N° 77.)
- 4- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151–162).
- 5- Didier Fontenile., (2008) : Écosystèmes, entomologie et lutte anti-vectorielle ; Dans Annales des Mines - Responsabilité et environnement 2008/3 N° 51.
- 6- Farenhorst M., Bart G. J. Knols, Matthew B. Thomas, Annabel F. V. Howard, Takken W., Rowland M., N'Guessan R. Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Plos one*, 2010, 5(8), e12081.
- 7- Favia G, Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N, Touré YT, Coluzzi M, 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect molecular biology*, 6(4) :377-383.
- 8- Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, Cheng Q, Hudson B. *Plasmodium knowlesi* in human, Indonesian Borneo. *Emerging Infectious Diseases* 2010, 16: 672.
- 9- Frédéric Darriet., ( 1998) : Lutte contre les moustiques nuisant et vecteurs de maladies Edition KARTALA.
- 10- Hardstone M.C., Leichter C.A. & Scott J.G. 2009. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 416–423.
- 11- Insecticide Resistance Action Commite (2014): Prévention Et gestion de la résistance aux insecticides ; Vecteur Jouant un rôle dans la santé publique Second Edition (IRAC) Décembre 2014.
- 12- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. *De Boeck Supérieur*, pp 112.

- 13- Martinez RE, Caballero MJ, Gándara B, Rogel MA, Lopez A M, Wang ET, Fuentes-Ramirez LE, Toledo I, Martinez L, Hernandez LI, Martinez RJ. Ecological, phylogenetic and taxonomic remarks on diazotrophs and related genera. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 38 : 155-160 p.
- 14- Mouchet J, Carnevale P : Les vecteurs de la transmission. In Danis M. et Mouchet J, le paludisme. *Ed. Marketing Ellipse / Aupelf. Paris*, 1991, 35-58.
- 15- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D et Givaudan, A. (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 220–231 p
- 16- Nikou D, Ranson H, Hemingway J: An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 2003, 318:91–102.
- 17- Nkya T.E., Akhouayri I., Kisinza W. & David J.-P. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 407–416.
- 18- OMPE, 2017 les moustiques et virus, *Caption placed here*
- 19- OMS., 2015 Méthodes de lutte antivectorielle de base.
- 20- Perera M.D.B., Hemingway J. & Karunaratne S.P. 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar J* 7: 168.
- 21-
- 22- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302.
- 23- OMS, 2017 : Rapport sur le paludisme fait par l’OMS Aide-mémoire N°94, 2017
- 24- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(4) : 520-529 pp.
- 25- WHO (2004): Framework for Developing, Implementing and Updating National Antimalarial Treatment Policy. A Guide for Country Malaria Control Programs. AFR/MAL/03.02. Brazzaville 2004.
- 26-. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M, 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13 : 1–7p.

- 27-** WHO, 1998. Tests procedures for insecticide resistance, monitoring in malaria vectors. Bioefficacy and persistence of insecticide in treated surfaces. Report of the WHO informal consultation, 17-20
- 28-** WHO. (2014). World Malaria Report. Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle Guide de l'instructeur - Guide du participant.
- 29-** WHO, 2016: World Malaria Report – OMS. Paludisme. Aide-mémoire N°94. Décembre 2016.