



**REPUBLIQUE DU BENIN**

\*\*\*\*\*

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

\*\*\*\*\*

**UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI / FACULTE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES (UAC/FAST)**

\*\*\*\*\*

**DEPARTEMENT DE ZOOLOGIE**

\*\*\*\*\*

**LICENCE EVOLUTION BIODIVERSITE DES ARTHROPODES ET  
ASSAINISSEMENT (LEBA)**

**Etude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux  
insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les  
communes de Cotonou et Malanville.**

**Présenté par:**

**Mèdégnonmi H. Linda TOWAKINOU**

**Sous la direction du:**

**Professeur Martin C. AKOGBETO**

**Directeur du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC)**

**C.R.E - COTONOU**

**2<sup>ème</sup> Promotion**

**Année académique: 2016 - 2017**

## Dédicace

A ma mère  
**Régina Monique O. AGBOTON**  
Sois heureuse d'assister à la présentation de ce travail.

## Remerciements

Il est impossible de citer ici les noms de tous ceux qui ont apporté une aide précieuse dans la réalisation de cette étude et dans la mise au point du présent rapport. Cependant je tiens à remercier :

- Le **Professeur Martin 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 vous avez été l'une des pièces maîtresses dans la création de la formation (LEBA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), ce qui m'a donné l'opportunité de continuer mes études dans un domaine peu connu mais très indispensable pour la santé humaine. Vous m'avez en plus offert l'opportunité de faire mon stage dans votre centre de recherche. C'est ici, le lieu de vous témoigner l'amour inconditionnel que j'ai pour vous. Merci de les recevoir en retour.

- Le **Professeur Michel SEZONLIN**, Coordonnateur adjoint de la Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Merci pour votre assistance et vos conseils toute au long de l'année universitaire. Sincère merci.

- Notre maître de stage, **Dr Germain Gil PADONOU**, pour sa contribution et sa motivation sans faille au CREC pendant les trois mois qu'ont duré les activités du présent rapport. Que le Seigneur vous bénisse.

- Tous nos enseignants de la Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA) à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Pour nous, vous avez été un modèle de réussite et d'une importance capitale tout au long de cette formation. Vous nous aviez inculqué le savoir à travers vos cours très compréhensibles et les travaux pratiques bien réalisés qui nous font rêver d'être enseignant chercheur. Recevez à travers ce document, nos sincères remerciements.

- les Chercheurs du CREC : **Razak OSSE, Rock AÏKPON, Rodrigue AGOSSA, Rodrigue ANAGONOU, Abdoul Sahabi Bangana BIO et Ramzyath AGBANRIN** pour leurs diverses contributions.

-**Mr Casimir KPANOU**, Doctorant, Entomologiste à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Merci à vous pour votre disponibilité, vos apports et vos conseils qui ont beaucoup contribué à la réalisation de ce rapport.

- **Mr Lazare HOUNKANRIN et Mr Issiaka ADELODJOU** pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation des travaux à l'insectarium du CREC.

- **Mr Hermann SAGBOHAN, Mr Idéophone AHOGNI, Mr Abou SIDICK, Juvénal AHOUANDJINOU, Wilfrid SEWADE, Grace OUSSOU** pour l'assistance, l'ambiance et la collaboration au laboratoire de biologie moléculaire ;
- Les **membres du Jury**, pour avoir accepté consacré votre temps à l'évaluation du présent rapport.
- Le personnel du CREC et tous les étudiants de la 2<sup>ème</sup> promotion de la LEBA pour l'ambiance fraternelle de travail.
- Tous nos proches qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail (famille, amis, aînés de filière, stagiaires du CREC...). A toutes et à tous, je redis un sincère merci.

## **Résumé**

Le paludisme demeure l'infection parasitaire la plus préjudiciable au monde avec 429 000 décès et 212 millions de cas en 2015. Les principales stratégies de lutte couramment utilisées contre cette maladie sont entre autres l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILD), les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent (PID) et les traitements antipaludiques efficaces. Malgré les efforts consentis, le paludisme continue d'être un fardeau pour les pays endémiques comme le Bénin. La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides constitue un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés et aucun citoyen ne devrait rester en marge du relèvement de ce défi. C'est ce qui a justifié notre stage au Centre de Recherche Entomologiques de Cotonou. Ceci nous a permis d'appliquer les connaissances théoriques reçues au cours de notre formation et de proposer une étude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville. Pour atteindre cet objectif, des prospections larvaires seront faites sur le terrain, l'élevage des larves à l'insectarium du CREC permettra d'obtenir des moustiques adultes dont les femelles âgées de 2 à 5 jours sont utilisées pour les bio-essais. Ces derniers seront effectués suivant le protocole OMS pour les tests en tubes OMS et le protocole CDC pour les tests en bouteilles CDC et ceci pour des doses multiples à la dose diagnostique de différents insecticides. Les moustiques vivants et morts des tests de sensibilité seront analysés par PCR (Polymerase Chain Reaction) selon le protocole de Santolamazza et *al.* (2008) pour la détermination des espèces moléculaires du complexe *An. gambiae* s.l. Les génotypes des mutations *Kdr* L1014F et *Ace-1* RG119S seront respectivement déterminés selon les protocoles de Martinez et *al.* (1998) et Weill et *al.* (2004). Environ 30 femelles d'*An. gambiae* s.l provenant de chacune des zones d'étude, âgées de 2 à 5 jours et qui n'étaient auparavant utilisées pour aucun test insecticide, seront utilisées pour des analyses biochimiques. Les résultats de cette étude permettront au PNLN de prendre des décisions fortes dans la gestion de la résistance et de la lutte antivectorielle en général au Bénin.

**Mot clés** : CREC, PNLN, Entomologie, Paludisme, *Anopheles gambiae*, Résistance.

## Abstract

Malaria remains the most harmful parasitic infection in the world with 429,000 deaths and 212 million cases in 2015. The main control strategies commonly used against this disease include the use of long-lasting insecticide-treated mosquito nets action (LLINs), indoor residual spraying (IRS) and effective antimalarial treatments. Despite the efforts made, malaria continues to be a burden for endemic countries such as Benin. The resistance of malaria vectors to insecticides is a handicap to the use of impregnated materials and no citizen should remain on the sidelines of this challenge. This justified our internship at the Entomological Research Center in Cotonou. This allowed us to apply the theoretical knowledge received during our training and to propose a study of the quantification of the intensity of the resistance of the vectors to the insecticides by using the biological methods of CDC and OMS in the communes of Cotonou and Malanville. To achieve this goal, larval surveys will be done in the field, larvae rearing at the CREC insectarium will obtain adult mosquitoes whose females aged 2 to 5 days are used for bioassays. These will be carried out according to the WHO protocol for WHO tube tests and the CDC protocol for CDC bottle tests and this for multiple doses at the diagnostic dose of different insecticides. Live and dead mosquito susceptibility tests will be analyzed by PCR (Polymerase Chain Reaction) according to the protocol of Santolamazza et al. (2008) for the determination of the molecular species of the *An. Gambiae* s.l. complex. The genotypes of Kdr L1014F and Ace-1 RG119S mutations will be respectively determined according to the protocols of Martinez et al. (1998) and Weill et al. (2004). About 30 females of *An. gambiae* s.l from each of the study areas, 2-5 days old and previously used for no insecticidal test, will be used for biochemical analyzes. The results of this study will enable the NMCP to take strong decisions in the management of resistance and vector control in general in Benin.

Key words: CREC, PNLP, Entomology, Malaria, *Anopheles gambiae*, Resistance.

## Liste des sigles et abréviations

***Ace-I*** : Acétylcholinestérase

***Ace-IR*** : Acétylcholinestérase Résistant

**AChE** : L'acétylcholinestérase

***al.*** : Collaborateurs

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

**CDC**: Centers for Diseases Control and Prevention

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

**CSP**: Circumsporozoïtic Protein

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

**FAST** : Faculté des Sciences et Techniques

***Kdr*** : knock-down résistance

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

**LLIP** : Laboratoire de Lutte Intégrée contre le Paludisme

**LMI** : Laboratoire Mixte International

**MILD** : Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PID** : Pulvérisation Intra Domiciliaire

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

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

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

**UAC** : Université d'Abomey Calavi

## Table des matières

Dédicace.....	i
Remerciements .....	ii
Résumé .....	iv
Abstract .....	v
Liste des sigles et abréviations.....	vi
Table des matières .....	vii
<b>1- Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>3-Description du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC).....</b>	<b>3</b>
3-1- Cadre physique .....	3
3-2- Personnel du CREC.....	5
3-3- Thématiques de recherche du CREC .....	7
3-4- Activités menées .....	7
3-4-1- Activités menées à l'insectarium.....	7
3-4-2- Elevage des moustiques .....	8
3-4-3- Test en tubes OMS .....	9
3-4-4- Test en bouteilles CDC .....	9
3-5- Difficultés rencontrées au cours du stage .....	10
<b>4- Etude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville.....</b>	<b>11</b>
4-1- Introduction .....	11
4-2- Objectifs.....	13
4-2-1- Objectif général .....	13
4-2-2- Objectifs spécifiques .....	13
4-3-1- Biologie de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	14
4-3-2- Stratégies de lutte antivectorielle contre le paludisme .....	15
4-3-2-1- La lutte contre les adultes .....	15

4-3-2-2- L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action.....	15
4-3-2-3- La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent .....	16
4-3-3- Les principales classes d'insecticides en santé publique.....	17
4-3-3-1- Les organochlorés .....	17
4-3-3-2- Les Organophosphorés.....	17
4-3-3-3- Les carbamates .....	17
4-3-3-4- Les pyréthrinoïdes .....	18
4-3-4- Mécanismes de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme .....	18
4-4- Matériels et méthodes.....	19
4-4-1- Zone d'étude .....	19
4-4-2- Méthodologie.....	20
4-4-2-1- Collecte des larves de moustiques .....	20
4-4-2-2- Test de sensibilité en tubes OMS.....	21
4-4-2-3- Test de bouteille CDC.....	22
4-4-2-5- Analyses biochimiques.....	23
4-5- Résultats attendus.....	23
5- Conclusion .....	23

**Liste des tableaux**

Tableau 1: Répartition des travaux à l'insectarium par semaine .....8

**Liste des figures**

Figure 1 : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou.....3

Figure 2 : Larvarium de l'insectarium .....4

Figure 3 : Salle d'émergence des moustiques adultes.....5

Figure 4 : Animalerie du CREC.....5

Figure 5 : Cycle de développement .....15

Figure 6 : Collecte des larves de moustiques .....21

Figure 7 : Réalisation des tests OMS .....22

## 1- Introduction

L'embranchement des Arthropodes occupe une place considérable dans le monde animal tant par sa diversité morphologique que par la multiplicité des biotopes qu'il occupe. Ces êtres vivants provoquent des nuisances pour l'homme et sont responsables de plusieurs maladies infectieuses les plus mortelles. Parmi eux, les moustiques (*Diptera: Culicidae*) sont les plus redoutables tant par leur abondance avec plus de 3000 espèces répertoriées (Rodhain et Perez, 1985), que par les maladies qu'ils véhiculent. Largement répandues dans les zones tropicales et subtropicales, les moustiques sont vecteurs du paludisme, des filarioses lymphatiques et d'arboviroses telles que la fièvre jaune, la dengue, les encéphalites virales. D'autres maladies d'importance locales sont la leishmaniose (phlébotomes), la maladie du sommeil (tsétsé ou glossines), l'onchocercose (simulies), la peste (puces), les rickettsioses (puces, poux, tiques), les borrélioses (poux et tiques) (Rodhain et Perez, 1985). Le paludisme, une maladie parmi tant d'autres est un problème majeur de santé publique en Afrique et un frein pour le développement des nations. Au regard de ces importants dégâts qu'occasionnent les arthropodes en général et les moustiques en particulier, leurs études sont d'une importance capitale tant pour le bien être de la santé humaine que pour les animaux. Ainsi le gouvernement béninois, pour la promotion de l'emploi met à la disposition des jeunes qui ont opté pour la recherche scientifique, des centres et laboratoire de recherche leur permettant de mettre en place des stratégies pour contrôler et lutter contre ce fléau. Dans cette optique et dans le cadre de notre formation professionnelle, nous avons été mis en stage de professionnalisation d'une durée de trois mois au Centre de Recherche Entomologiques de Cotonou. Pendant cette période nous avons approfondi l'ensemble des connaissances acquises au cours de notre formation Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA). Au cours de ce stage, nous avons eu à effectuer plusieurs activités. Dans les lignes à suivre, nous présenterons les 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 un domaine de recherche au CREC : Etude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville.

## **2- Objectifs**

### **2-1- Objectif général**

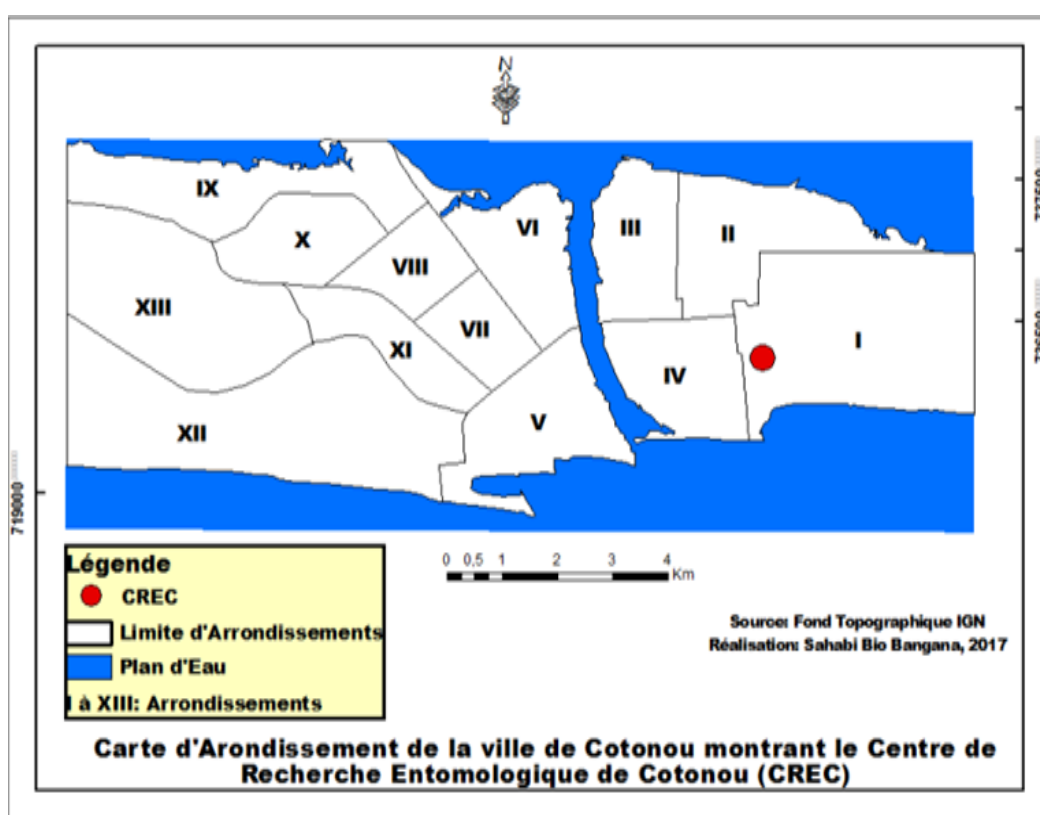
L'objectif général visé est d'appliquer les connaissances acquises en lien avec les activités du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou.

### **2-2- Objectifs spécifiques**

- Appréhender les techniques d'échantillonnage et d'élevage des moustiques et les pratiques de laboratoire de recherche.
- Proposer un projet de recherche sur la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville.

### 3-Description du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC)

Le Centre de Recherche Entomologiques de Cotonou (CREC) a été le cadre physique ayant abrité nos travaux de recherche. C'est un centre de recherche par excellence situé au sein du Ministère de la Santé. On y compte deux unités spécialisées à savoir l'entité de Parasitologie et celle d'Entomologie dans laquelle s'est déroulée la majeure partie de nos travaux. Il est installé dans la même enceinte que le Service National des Laboratoires de Santé Publique et est limité au Nord par le Centre National de Télédétection (CENATEL), au Sud par le bâtiment ayant abritée 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 d'Hygiène des Eaux et Aliments (SHEA).



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

#### 3-1- Cadre physique

Le centre dispose d'une direction composée d'un secrétariat, d'un service administratif et financier, de quatre laboratoires d'analyse et de recherche sur les maladies à transmission vectorielle, d'un insectarium et d'une animalerie. Ces laboratoires sont :

- ✓ Le laboratoire de biologie moléculaire où se font les tests moléculaires (PCR) et les tests de positivité aux antigènes circum-sporozoïtiques (Elisa CSP) des vecteurs du paludisme.

- ✓ Le laboratoire de contrôle de qualité des moustiquaires imprégnées d'insecticides.
- ✓ Le laboratoire de parasitologie chargé des essais cliniques puis de l'évaluation de la chimiosensibilité du *Plasmodium falciparum* aux anti-malariques.
- ✓ Le laboratoire d'entomologie appliquée où se fait l'identification et la dissection des insectes diptères à intérêt médical et des moustiques en particulier.
- ✓ L'insectarium du CREC, qui est composé de deux blocs. Le premier bloc appelé larvarium (figure 2) où sont élevées les larves de différentes souches de moustiques. Ce bloc est constitué de deux compartiments A et B éclairé par des lampes incandescentes. Le matériel de travail est représenté par les bacs, les voiles, les levures et les croquettes de chat pour l'élevage des larves et l'incubation des œufs. Le compartiment A accueille les larves de différents genres de moustiques qui proviennent du terrain (populations sauvages). Le compartiment B reçoit les larves de la souche sensible *An. gambiae* 'Kisumu' originaire du Kenya et la souche 'VK-Per' originaire de Bobo-Dioulasso au Burkina-Faso.



**Figure 2 :** Larvarium de l'insectarium (Towakinou CREC 2018)

Le second bloc est appelé salle des adultes (figure 3). Il est composé de deux compartiments C et D, des cages, des voiles de cages et de climatiseur pour le réglage 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 *An. gambiae* 'Kisumu'.



**Figure 3 :** Salle d'émergence des moustiques adultes (Towakinou CREC 2018)

- ✓ L'animalerie (figure 4) s'occupe d'élevage de petits mammifères rongeurs (des lapins, des cobayes) et des pigeons sur qui les moustiques se gorgent (prise de sang) pour la maturation de leurs ovaires et la ponte (reproduction des moustiques).



**Figure 4 :** Animalerie du CREC (Towakinou CREC 2018)

### 3-2- Personnel du CREC

Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou dispose d'un personnel essentiellement local, d'un directeur, d'un service administratif et financier et des enseignants chercheurs, de chercheurs, d'étudiants en thèse de doctorat et masters qui conduisent conjointement des programmes de recherche sur les vecteurs de paludisme et autres organismes nuisibles. Ce personnel se présente comme suit :

- **le Directeur du CREC** : Professeur Martin AKOGBETO, Coordonnateur de la LEBA, Enseignant à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi. Il est 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 de doctorat ;

- **les Secrétaires** qui **sont** Madame Clémence DURAND et Balbine KINDJI. Elles sont chargées de la gestion des dossiers administratifs ;
- **le service administratif et financier** représenté par Mr Idrissou SALIFOU. 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;
- **le responsable du laboratoire de biologie moléculaire** : Docteur OSSE Razack, Enseignant chercheur à l'université de Kétou. Il assure le bon fonctionnement du laboratoire, dirige les différents tests moléculaires et biochimiques qui sont réalisés dans ledit laboratoire sur les moustiques. Il coordonne la formation des ressortissants étrangers en destination du CREC. Il veille également aux respects des règles d'hygiènes au niveau du laboratoire;
- **le responsable du laboratoire de Contrôle de Qualité** : Monsieur Idelphonse AHOGNI. Ce laboratoire assure l'appréciation de l'amélioration de l'efficacité, la rentabilité, la pertinence écologique et la durabilité des méthodes de lutte.
- **le responsable du laboratoire d'Entomologie Appliquée** : Dr Germain Gil PADONOU, Enseignant chercheur à l'UAC. Il assure le fonctionnement du laboratoire, où les moustiques et autres insectes d'intérêts forensique sont identifiés et disséqués après leurs captures sur le terrain.
- **le responsable de l'unité de parasitologie** : Dr Alain NAHUM, coordonnateur des projets d'évaluation de la chimio-sensibilité du *Plasmodium falciparum* aux anti-malariques (essais thérapeutiques). Il travaille en collaboration avec plusieurs médecins, des parasitologues et environnementalistes ;
- **le responsable de l'insectarium** : Mr Sébastien KOUDENOUKPO. Il est chargé du suivi et du contrôle de l'élevage des moustiques, ainsi que du fonctionnement de l'insectarium. Il est assisté dans sa mission par Lazare HOUNKANRIN et Issiaka ADELLODJOU ;

**Les enseignants chercheurs du centre sont :**

- Professeur titulaire Martin AKOGBETO, directeur du CREC et membre de l'académie des sciences du Benin.

- 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 ;
- Dr Rock AIKPON, enseignant chercheur au centre universitaire de Natitingou et entomologiste au CREC ;
- Dr Ange YADOULETON, enseignant chercheur au centre universitaire de Natitingou et entomologiste au CREC ;
- Dr Abdoul Sahabi BIO BANGANA, enseignant chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture (UNA) et environnementaliste au CREC ;
- Dr Rodrigue ANAGONOU, chercheur entomologiste au CREC ;
- Dr Rodrigue Fiacre AGOSSA, chercheur entomologiste au CREC ;
- Dr Ramzyath,AGBARIN chercheur entomologiste au CREC ;
- Doctorants Casimir KPANOU, Hermann SAGBOHAN, Albert SALAKO, Idelphonse AHOGNI, Come KOUKPO, Arsène FASSINOU et André SONINAHOUN qui effectuent des travaux de thèse de doctorat au CREC.

### 3-3- Thématiques de recherche du CREC

Les travaux du CREC s'articulent principalement autour de deux axes :

➤ **L'unité d'entomologie :**

- Biologie et caractérisation des vecteurs du paludisme ;
- Etude de la transmission du paludisme et de la résistance des vecteurs aux insecticides ;
- Evaluation de l'efficacité des outils de lutte contre le paludisme ;
- Evaluation en phase expérimentale des insecticides.

➤ **L'unité de parasitologie clinique :**

- Assure des essais thérapeutiques
- Evaluation de la chimio- sensibilité du *plasmodium falciparum* aux anti- malariques.

### 3-4- Activités menées

Au cours de notre stage au CREC, plusieurs activités ont été réalisées aussi bien à l'insectarium et au laboratoire.

#### 3-4-1- Activités menées à l'insectarium

A l'insectarium, les activités menées chaque semaine sont réparties dans le tableau 1 suivant :

**Tableau 1** : Répartition des travaux à 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		

### 3-4-2- Elevage des moustiques

A l'insectarium, les larves sont triées, séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs étiquetés contenant de l'eau. Les larves sont nourries avec des croquettes de chat qui sont des aliments riches en protéines 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.

### 3-4-3- Test en tubes OMS

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours identifiés comme *An. 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. Pour chaque insecticide, cinq tubes à essai ont été utilisés : un papier non traité comme un contrôle et quatre papiers traités pour l'exposition des moustiques. Une moyenne de 20-25 moustiques a été introduite dans chaque tube. Les femelles *Anopheles gambiae* utilisées ont été exposés pendant une heure aux papiers imprégnés d'insecticide. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous le choc de l'insecticide (effet Knock-down) au bout de différents intervalles de temps (0, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) d'exposition a été enregistré. Après 60 minutes d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes contenant des papiers non traités et mis en observation (25°C .et 80% d'humidité) et nourris au jus de miel à 10%. La mortalité au bout de 24 heures a été déterminée selon le protocole de l'OMS.

La résistance aux insecticides sera évaluée par le taux de mortalité estimé comme suit :

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

Le statut de résistance des moustiques testés a été déterminé selon les critères de l'OMS. Toute population *An. gambiae* s.l dont le taux de mortalité est compris entre 98 et 100% est considérée comme sensible. Quand la mortalité est située entre 90 et 97%, les spécimens de ce groupe sont considérés comme appartenant à une population de suspects de résistance à confirmer. Lorsque la mortalité est inférieure à 90%, la population est considérée comme résistante.

### 3-4-4- Test en bouteilles CDC

Quatre flacons différents contenant l'insecticide perméthrine avec différentes doses diagnostiques (1X, 2X, 5X et 10X) et un flacon témoin contenant uniquement de l'acétone ont été utilisés. Les différentes doses insecticides sont fournies par CDC, Atlanta. Chaque dose est diluée dans de l'acétone (48 ml) pour fournir une solution mère à une concentration de 21,5 µg/ml (1X), 43 µg/ml (2X), 107,5 µg/ml (5X) et 215 µg/ml (10X), respectivement pour chaque dose diagnostique. Pour enduire les bouteilles CDC, une solution de 1 ml a été ajoutée à une bouteille de Wheaton 250 ml laissées séchées pendant toute une nuit. Environ 15 à 20 moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours ont été exposés pendant 2 heures. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous le choc provoqué par l'insecticide (effet knock-down) sont enregistré par intervalles de temps (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 et 120 minutes). Après 2 heures d'exposition, le test est interrompu.

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

Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou offre un bon cadre pour la recherche mais certaines difficultés ont été également rencontrées au cours de notre stage. Parmi les difficultés rencontrées, figurent :

- L'exposition du personnel aux piqûres de moustiques :

Cette exposition est due au lâché des moustiques lors des récoltes des moustiques adultes qui s'échappent maladroitement des bacs ou des cages ;

- Le temps relativement court du stage ne nous a pas permis de bien s'imprégner des différentes activités menées au centre.
- L'accès parfois limité de la connexion internet freine nos recherches.

## **4- Etude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville**

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

Le paludisme demeure l'un des problèmes majeurs de santé publique et constitue un véritable frein au développement socio-économique (WHO, 2009). C'est une maladie parasitaire très répandue dans le monde, transmise à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique du genre *Anopheles* (Pennetier et al. 2007, Bruce-Chwatt., 1987). Les efforts de lutte déployés au niveau mondial contre cette maladie ont entraîné une diminution du nombre de décès dus au paludisme. Au niveau mondial, la baisse du nombre de cas de paludisme est estimée à 18 %, de 262 millions en 2000 (plage comprise entre 205 et 316 millions) à 214 millions en 2015 (plage comprise entre 149 et 303 millions) (WHO, 2015). La plus grande contribution à cette baisse a été l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILD), les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent (PID) et les traitements antipaludiques efficaces. Beaucoup d'efforts ont été consentis pour augmenter l'accessibilité des populations aux moustiquaires imprégnées, en particulier aux enfants de moins de cinq ans et aux femmes enceintes. Malheureusement, des problèmes importants subsistent mettant en danger les objectifs et la pérennité des réalisations. La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides constitue un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés. Suite à la baisse observée de sensibilité d'*Anopheles gambiae* aux pyréthrinoïdes, la résistance des vecteurs aux insecticides est devenue un domaine de recherche prioritaire en Afrique depuis quelques années (Elissa et al. 1993 ; Zaim et al. 2002; Awolola et al. 2009). C'est aussi le cas du Bénin où la résistance aux pyréthrinoïdes (Akogbeto, 1999 ; N'guessan, 2007 ; Padonou et al 2012) et carbamates (Aikpon et al ; 2014) est observée.

Cette dernière décennie, le Bénin est confronté au problème récurrent de résistance des vecteurs aux insecticides. Tous les pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires sont concernés : perméthrine (Olyset Net), deltaméthrine (Perma Net, Dawa), alpha cyperméthrine (Duranet). Les organophosphorés ne sont pas exclus de cette liste car la baisse de sensibilité d'*Anopheles gambiae* au fénitrothion et au propoxur a été enregistrée. Toutefois, aucune résistance au pyrimiphos méthyl utilisé en PID n'a été enregistrée dans l'Atakora mais étant donné que la résistance est un phénomène dynamique, il n'est pas exclu qu'il ait émergence de la résistance des vecteurs à cet insecticide dans le futur. Ainsi, l'évolution de la situation doit être suivie chaque année et servir de guide aux Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme. Pour ce faire, les régions endémiques du paludisme comme le Bénin doivent surveiller régulièrement l'existence et l'intensité

de la résistance aux insecticides susceptibles de compromettre l'efficacité des interventions de lutte antivectorielle à base d'insecticides pour réduire significativement le fardeau du paludisme.

La résistance des vecteurs aux insecticides peut être évaluée à l'aide des tests de sensibilité OMS et des tests CDC. Cependant, les tests de sensibilité OMS renseignent uniquement sur la sensibilité (Taux mortalité  $\geq 98\%$ ) ou la résistance d'une population particulière de moustiques au taux de mortalité inférieur à 90% et ne fournissent pas beaucoup de détails sur les différents niveaux d'intensité de résistance. Ainsi, une population avec 08% de mortalité pour un insecticide et une autre avec 89% de mortalité pour le même insecticide sont classées comme résistantes, malgré le fait que la différence entre ces deux taux de mortalité soit significative et donc les deux niveaux devraient avoir différents niveaux d'impact sur la lutte antivectorielle. De plus, ces principales méthodes d'évaluation de la résistance des vecteurs aux insecticides (tests OMS et CDC) ne permettent que la détermination de la résistance à une dose fixe pour des populations variables. Par exemple, le nord du Bénin est considéré comme une zone à forte résistance aux insecticides notamment les pyréthrinoides (Akogbeto & Yakoubou 1999; Yadouleton et al. 2010; Djègbè et al. 2011; Aïkpon et al. 2013; Aïzoun et al. 2013) mais l'intensité de cette résistance et son impact dans la lutte antivectorielle reste inconnue. C'est dans ce contexte que nous avons choisi mené la présente étude portant sur « **Etude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville** ».

## **4-2- Objectifs**

### **4-2-1- Objectif général**

L'objectif global de la présente étude est de quantifier l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville.

### **4-2-2- Objectifs spécifiques**

De façon spécifique, il s'agit de :

- Evaluer la sensibilité de *An. gambiae* s.l aux insecticides dans les communes de Cotonou et Malanville ;
- Déterminer les génotypes *Kdr* et *Ace-1* de *An. gambiae* s.l après exposition à des doses croissantes d'insecticides;
- Faire la biochimie de *An. gambiae* s.l dans les communes de Cotonou et Malanville selon le protocole décrit par Hemingway (Hemingway et al, 1998).

### 4-3- Synthèse bibliographique

#### 4-3-1- Biologie de *Anopheles gambiae* s.l

Les Anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement comporte deux phases (figure 5) :

- ✓ 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. A la fin du stade larvaire survient la mue nymphale. Le stade nymphal dure 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 d'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 pré gravide facultative, et de 2 à 3 jours pour les cycles suivants qui ne nécessitent qu'un seul repas de sang. La durée moyenne de vie des adultes varie de 3 à 4 semaines selon les espèces et les conditions climatiques.

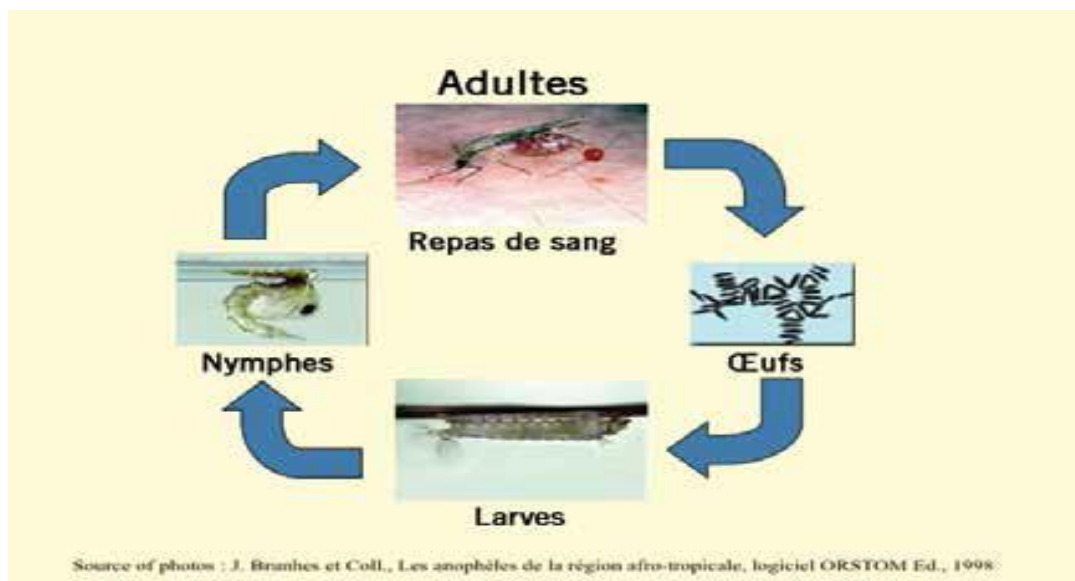


Figure 5 : Cycle de développement d'un Anophèle

#### 4-3-2- Stratégies de lutte antivectorielle contre le paludisme

La lutte antivectorielle regroupe toutes les méthodes physiques, biologiques et/ou chimiques utilisées pour rompre la chaîne épidémiologique au niveau du vecteur. Les stratégies adoptées ont pour but de diminuer la densité des populations de vecteurs à un niveau très bas, et/ou de limiter le contact homme-vecteur. Depuis la découverte du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) par Müller en 1939, les insecticides chimiques constituent le principal moyen de lutte contre les moustiques. Ils sont utilisés comme larvicides et imagocides.

##### 4-3-2-1- La lutte contre les adultes

La lutte imagocide repose principalement sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide et la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide rémanent.

##### 4-3-2-2- L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action.

L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action est l'une des méthodes les plus efficaces et la méthode la plus répandue dans les pays endémiques. Cette stratégie qui vise à établir une barrière (physique et/ou chimique) entre l'homme et le moustique est utilisée depuis longtemps pour se protéger des piqûres de moustiques (Snow *et al.* 1987). L'efficacité des moustiquaires a été renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticides (Darriet *et al.* 1984). Actuellement, cette imprégnation se fait au moyen des pyréthrinoïdes qui sont les seuls insecticides recommandés pour le traitement des moustiquaires. Il convient de relever que ces pyréthrinoïdes ont un effet excito-répulsif important, mais spécifique pour la plupart des espèces de vecteurs. L'imprégnation réalisée à l'aide de ces pyréthrinoïdes protège efficacement le dormeur d'une

barrière chimique qui renforce la barrière physique souvent affaiblie par les trous et les déchirures. L'effet létal de l'insecticide contribue à faire baisser la densité des vecteurs et le taux d'agressivité alors que l'effet répulsif de l'insecticide empêche les piqûres à travers la moustiquaire et la pénétration des moustiques à travers les trous. Cette utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides est une mesure de protection personnelle efficace. Plusieurs études effectuées sur les évaluations de l'efficacité des moustiquaires imprégnées de perméthrine et de deltaméthrine ont donné des résultats satisfaisant (Carnevale *et al.* 1988 ; Li zuzi *et al.* 1987 ; Snow *et al.* 1988). Mais, la nature nomade de certains groupes ethniques, les habitudes culturelles des paysans, les habitudes des villageois à dormir hors de leur case pendant les périodes de chaleur et les représentations liées aux croyances sont autant de barrières qui peuvent rendre inefficaces l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. A cela s'ajoute son coût élevé, car elle reste pour beaucoup de gens résidant dans les zones rurales, inaccessible car trop onéreuse. Par contre, en milieu urbain où les revenus et le niveau de vie sont supérieurs, l'usage de la moustiquaire imprégnée pourrait être généralisé afin de protéger efficacement les populations contre les moustiques (Hougard, 1991).

#### **4-3-2-3- La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent**

La pulvérisation (ou aspersion) intradomiciliaire (PID) d'insecticides à effet rémanent peut être définie comme l'application d'un insecticide liquide qui sèche et forme un dépôt cristallin rémanent sur les surfaces pulvérisées (Najera et Zaim, 2004). Le principe de la méthode repose sur le comportement des vecteurs qui recherchent après chaque repas de sang, des endroits tranquilles et sombres pour le repos et la digestion. La PID permet ainsi de tuer les moustiques qui se posent sur les surfaces traitées avant et/ou après la prise de repas sanguins. Elle induit une mortalité très importante des vecteurs adultes en réduisant leur longévité et par conséquent la probabilité que le *Plasmodium* puisse achever son développement en leur sein. De cette façon, cette méthode baisse le taux d'agressivité pour l'homme ainsi que l'espérance de vie infectante du vecteur, deux facteurs déterminants de sa capacité vectorielle (Macdonald, 1955). Cette application d'insecticide a été la principale méthode de lutte de la campagne pour l'éradication du paludisme des années 1950 et 60. Elle a contribué à l'élimination du paludisme dans de nombreuses régions du monde et à sauver des milliers de vies humaines. Pour des raisons techniques et opérationnelles, la PID a été abandonnée à la fin des années 60 et n'a été maintenue qu'en Afrique australe et dans les hautes terres d'Afrique de l'Est et de Madagascar. Mais, depuis janvier 2006, la PID est recommandée par le programme de lutte contre le paludisme de l'OMS (GMP) pour toutes les zones d'endémie, en combinaison avec l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée d'action pour la lutte antivectorielle. Le choix de l'insecticide et de la formulation à appliquer reposent sur la sensibilité

des vecteurs locaux, les caractéristiques des divers composés, le coût et une collaboration soutenue de la population. Il faut également tenir compte d'autres problèmes locaux spécifiques, tels que les contaminations potentielles ou les effets néfastes sur des cultures essentielles pour l'économie locale.

#### **4-3-3- Les principales classes d'insecticides en santé publique**

Il existe une vingtaine de molécules utilisées comme insecticides en santé publique.

##### **4-3-3-1- 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. Le DDT a été abandonné à cause de son accumulation dans les chaînes alimentaires et de l'apparition de la résistance.

##### **4-3-3-2- Les Organophosphorés**

Ce sont des dérivés de l'acide phosphorique ou de l'acide thiophosphorique. 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 chlorpyrifos comme larvicides ou imagocides en aspersion intra-domiciliaires (Mouchet et Carnevale, 1991). Les formes oxydées des organophosphorés (oxons) sont de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) entraînant l'accumulation de l'acétylcholine (neuromédiateur d'excitation) dans les jonctions synaptiques. 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 (Bourguet, 1996).

##### **4-3-3-3- 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 (Bourguet, 1996). Mais l'inhibition est plus rapidement réversible dans le cas des carbamates que dans le cas des organophosphorés (Menozzi, 2000). C'est à la famille des carbamates qu'appartient le bendiocarbe, un insecticide en usage en pulvérisation intradomiciliaire au Bénin depuis 2008.

#### **4-3-3-4- Les pyréthriinoïdes**

Selon leur origine, les pyréthriinoïdes ont été classés en pyréthriinoïdes naturelles ou insecticides botaniques extraites des plantes (Solanaceae, Compositaceae) et en pyréthriinoïdes synthétiques (*Ca* boxylester). Les pyréthriinoïdes 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. Les pyréthriinoïdes sont largement utilisés en agriculture (Chandre *et al.* 1999 ; Diabaté *et al.* 2004) et 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, la cyperméthrine et la cyfluthrine.

#### **4-3-4- Mécanismes de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme**

La résistance est l'apparition dans une population d'insectes, d'individus ayant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce (WHO, 1976).

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec des cibles biologiques présentes chez l'insecte. Plusieurs étapes sont nécessaires avant que l'insecticide n'exerce son action. Il doit d'abord entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans son organisme, être transformé dans certains cas en métabolite actif, puis transporté jusqu'à la cible. Chacune de ces étapes est sous le contrôle d'un ou de plusieurs gènes. Tout mécanisme qui modifie l'une de ces étapes peut conduire donc à une résistance. La résistance peut impliquer un comportement d'évitement de l'insecte qui ne rentre plus en contact avec l'insecticide (résistance comportementale), une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, une modification des voies métaboliques ou enfin une modification de sa cible.

Trois termes sont employés pour décrire les patrons de résistance des insectes aux substances chimiques : résistance simple, résistance croisée, résistance multiple et résistance multiplicatives (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 chez 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 à plusieurs insecticides avec des modes d'actions différents mais qui sont métabolisés par les mêmes enzymes (isoenzymes) (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.

#### **4-4- Matériels et méthodes**

##### **4-4-1- Zone d'étude**

L'étude sera réalisée dans deux communes du Bénin, l'une dans l'extrême nord, la commune de Malanville dans le département de l'Alibori et l'autre dans le sud du pays, la commune de Cotonou dans le département du Littoral.

##### **➤ Malanville**

La commune de Malanville est située à l'extrême Nord de la République du Bénin. Elle couvre une superficie de 3016 Km<sup>2</sup> dont 8000 ha de terres cultivables. Sa population est de 168006 habitants (INSAE 2013). Son altitude moyenne est de 200 m au-dessus du niveau de la mer dont elle est à plus de 700 Km à vol d'oiseau. Le climat de la commune de Malanville est de type Nord-soudanais marqué par une saison sèche de Novembre à Avril. La moyenne des pluies enregistrées les cinq (05) dernières années est de 750mm. Le vent dominant est l'harmattan soufflant de Novembre à Janvier tous les ans avec des écarts de température variant entre 16°C et 25°C. La commune de Malanville est traversée dans sa longueur (est-ouest) par le fleuve Niger avec ses affluents. Il s'agit de l'Alibori, du Mékrou et de la Sota qui sont en crue durant les mois d'Août et de Septembre. La commune connaît des inondations cycliques du fait des pluies diluviennes. La végétation de la commune de Malanville est constituée par la savane arborée avec une prédominance de formations herbacées (Ahoyo & Guidibi 2006).

##### **➤ Cotonou**

Le département du Littoral est la commune de Cotonou érigée en département par le dernier découpage administratif. Il est le plus petit des douze (12) départements du Bénin en termes de superficie. Il s'étend sur 10 km à l'Ouest où il est limité par la commune d'Abomey-Calavi du département de l'Atlantique et sur 6 km à l'Est en côtoyant la commune de Sème-kpodji du département de l'Ouémé.

La commune de Cotonou est située au croisement des 6°20 de parallèle Nord et de 2°20 méridien Est. L'océan Atlantique forme la limite sud de la commune (département). Au nord, il est limité par

le lac Nokoué, et a une superficie de 79 Km<sup>2</sup>. Il est composé de 13 arrondissements et de 140 quartiers de ville.

Le relief du Littoral est assez homogène et les côtes IGN oscillent entre + 0,4 m et + 6,5 m. Le département est situé sur un cordon littoral constitué d'une bande de sable alluvial qu'articule un système lagunaire qui se communique par endroits et qui s'étend sur environ 200 km de l'Ouest à l'Est entre la ville de Lomé au Togo et la ville de Lagos au Nigéria.

Du point de vue pluviométrique, le département du Littoral obéit aux mêmes lois climatiques que tout le sud du Bénin. On distingue en effet deux saisons de pluies et deux saisons sèches.

Ce sont :

- une grande saison des pluies de mi-mars à mi-juillet,
- une saison sèche de mi-juillet à mi-septembre,
- une petite saison des pluies de mi-septembre à mi-novembre,
- une grande saison sèche de mi-novembre à mi-mars.

Les précipitations ont lieu principalement entre mars et juillet avec un maximum en juin (300 mm à 500 mm). En ce qui concerne les sols, le département du Littoral s'étend sur des sols sableux, acides dans leur majeure partie. Le couvert végétal est difficile à recenser en raison de l'occupation très dense de l'espace urbain ayant fait disparaître les essences caractéristiques des sols sablo-argileux et hydromorphe remplacées par des essences anthropiques.

Les activités pratiquées dans le département du Littoral sont multiples et tournent autour de quelques industries manufacturières, de la pêche, de l'élevage, du jardinage et surtout du commerce. La pêche est relativement développée et mobilise beaucoup de personnes, des nationaux comme des étrangers.

#### **4-4-2- Méthodologie**

##### **4-4-2-1- Collecte des larves de moustiques**

Des larves de *Anopheles gambiae* s.l seront échantillonnées de septembre 2018 à novembre 2018 dans différents gîtes larvaires (figure 6) dans les communes de Cotonou et Malanville. Les larves collectées seront élevées dans le larvarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) jusqu'au stade adulte. Les adultes issus de l'émergence des larves collectées sur le terrain et mis en cage seront nourris au jus de miel (10%). Les femelles adultes de 2 à 5 jours seront isolées pour être soumises aux tests de sensibilité aux différents insecticides.



Figure 6 : Collecte des larves de moustiques

#### 4-4-2-2- Test de sensibilité en tubes OMS

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiées comme *An. gambiae* s.l seront exposées à des doses diagnostiques croissantes (dose 1X, 5X, 10X) de perméthrine pour les tests de sensibilité en utilisant les papiers imprégnés d'insecticides comme décrit par le protocole standard des tests OMS (WHO 2013). Les différentes doses de perméthrine suivantes seront testées: permethrine 0.75% (1X) ; permethrine 0.75% + PBO (1X+ PBO) ; permethrine 3.75% (5X) ; permethrine 3.75% + PBO (5X + PBO) ; permethrine 7.5% (10X) ; permethrine 7.5% + PBO (10X + PBO). Pour chaque dose d'insecticide, six tubes à essai contenant deux papiers non traités (tubes témoins) et quatre papiers traités (tubes tests) pour l'exposition des moustiques seront utilisés. Une moyenne de 20 à 25 moustiques femelles sera introduite dans chaque tube. Les femelles d'*Anopheles gambiae* s.l utilisées dans cette étude seront exposées pendant une heure aux papiers imprégnés d'insecticide. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous le choc provoqué par l'insecticide (effet knock-down) au bout de différents intervalles de temps (0, 15, 30, 45, 60 minutes) d'exposition sera enregistré. Après 60 minutes d'exposition, les moustiques seront transférés dans des tubes contenant des papiers non traités et mis en observation (25°C et 80% d'humidité) avec un accès libre au jus sucré (jus de miel à 10%). L'effet Knock-down sera lu à nouveau pendant une heure à différents intervalles de temps (75, 90, 105, 120 minutes) puis la mortalité au bout de 24 heures sera déterminée selon le protocole de l'OMS.



Figure 7 : Test en tube OMS

#### 4-4-2-3- Test de bouteille CDC

Quatre flacons différents contenant l'insecticide perméthrine avec différentes doses diagnostiques (1X, 2X, 5X et 10X) et un flacon témoin contenant uniquement de l'acétone seront utilisés. Les différentes doses insecticides seront fournies par CDC, Atlanta. Chaque dose sera diluée dans de l'acétone (48 ml) pour fournir une solution mère à une concentration de 21,5 µg/ml (1X), 43 µg/ml (2X), 107,5 µg/ml (5X) et 215 µg/ml (10X), respectivement pour chaque dose diagnostique. Pour enduire les bouteilles CDC, une solution de 1 ml sera ajoutée à une bouteille de Wheaton 250 ml laissées séchées pendant toute une nuit. Environ 15 à 20 moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours seront exposés pendant 2 heures. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous le choc provoqué par l'insecticide (effet knock-down) sera enregistré par intervalles de temps (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 et 120 minutes). Après 2 heures d'exposition, le test sera interrompu.

#### 4-4-2-4- Identification des espèces et formes moléculaires au sein du complexe *An. gambiae* s.l. et caractérisation moléculaire des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1*

Après l'identification morphologique, les moustiques issus des tests de sensibilité seront soumis aux tests de biologie moléculaire en fonction des objectifs de chaque étude. Les femelles d'anophèles seront analysées à la PCR selon le protocole de Scott *et al.* (1993) pour la détermination des différentes espèces de *An. gambiae* s.l., puis selon le protocole de Favia *et al.* (1997) pour l'identification des différentes formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. Les mutations *Kdr* Leu-Phe et *Ace-1* G119S seront 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 au sein des moustiques sera calculée.

#### 4-4-2-5- Analyses biochimiques

Environ 30 femelles d'*Anopheles gambiae* s.l provenant de chacune des zones d'étude, âgées de 2 à 5 jours et qui n'étaient auparavant utilisées pour aucun test insecticide, seront utilisées pour des analyses biochimiques. Avant ces analyses, des spécimens de *An. gambiae* s.l seront tués dans le froid. Des dosages biochimiques seront réalisés pour comparer le niveau d'activité des oxydases mixtes (MFO), des estérases non spécifiques ( $\alpha$  et  $\beta$ -estérases) et des glutathion S-Transférases (GST) (Bradford, 1976) des différentes populations de moustiques à la souche sensible Kisumu. Tous les moustiques du genre *Anopheles gambiae* s.l seront testés selon le protocole décrit par Hemingway (Hemingway et al, 1998).

#### 4-5- Résultats attendus

Au terme de nos travaux, les résultats suivants seront obtenus :

- ✓ Le statut de résistance de *Anopheles gambiae* s.l dans les communes de Cotonou et Malanville sera établi ;
- ✓ Les principaux gènes et mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs aux insecticides seront détecté ;
- ✓ L'intensité de la résistance des vecteurs à différentes doses multiples d'insecticides sera évaluée ;

#### 5- 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. L'étude de la quantification de l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides en utilisant les méthodes biologiques de CDC et OMS dans les communes de Cotonou et Malanville contribuerait à connaître l'intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides et son impact dans les stratégies de lutte antivectorielle au Bénin. Cette étude permettra de déterminer les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs aux insecticides dans les deux communes. Les résultats de cette étude permettront au PNLN de prendre des décisions fortes dans la gestion de la résistance et de la lutte antivectorielle en général.

## Référence bibliographique

- 1- Ahoyo Adjovi, N., E. GUIDIBI. 2006. Monographie de la commune de Malanville. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
- 2- Aïkpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, Oké-Agbo F, et al. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors*. 2013; 6:192.
- 3- Aïkpon R, Sèzonlin M, Ossè R, Akogbéto M. Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. *Parasit Vectors*. 2014;7:568.
- 4- Aïzoun N, Aïkpon R, Gnanguenon V, Oussou O, Agossa F, Padonou G, Akogbéto M: Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato from the south and north Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 2013, 6:274.
- 5- Akogbetto M, Yakoubou S. [Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa] (in French). *Bull Soc Pathol Exot*. 1999; 92:123–30.
- 6- Bourguet D, Raymond M, Fournier D, Malcolm CA, Toutant JP, Arpagaus M, 1996. Existence of two Acetylcholinesterases in the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Neurochemistry*, 67: 2115-2123
- 7- Bruce-Chwatt, L.J. 1987. Malaria and its Control: Present Situation and Future Prospects. *Annual Review of Public Health* 8: 75–110.
- 8- Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L, Gazin P, Richard A, Mouchet J : La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyrèthrinoïdes au Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot* 1988, 81: 832-46.
- 9- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbetto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P, 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (3):230-234.
- 10-Corbel V, Duchon S, Zaim M, Hougard JM: Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. *J Med Entomol* 2004, 41:712-717.
- 11-Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabiré RK, Hougard JM, Akogbetto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Chandre F, 2004. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and phenomena. *Tropical Medicine and International Health*, 9 : 1267-1273
- 12-Djègbè, I, O. Boussari, A. Sidick, T. Martin, H. Ranson, F. Chandre, M. Akogbetto, V. Corbel. 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence

- of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal* 10: 261.
- 13-Gillies MT, De Meillon B: The Anophelinae of Africa South of the Sahara. Johannesburg: Publication of the South African Institute for Medical Research; 1968.
- 14-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.
- 15-Hemingway H., Nicholson A., Stafford M., Roberts R., Marmot M. The impact of socioeconomic status on health functioning as assessed by the SF-36 questionnaire: the Whitehall II study. *American Journal of Public Health*, 1998, 87, 1484–1490.
- 16-Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique (INSAE), ICF International. 2013. Enquête démographique et de santé et à indicateurs multiples du Bénin eds-micsiv 2012-2013. Cotonou.
- 17-Lepoivre P. 2003. Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte. *De Boeck Supérieur*. Pp 112.
- 18-Macdonald, G. 1955. The Measurement of Malaria Transmission. Proceedings of the
- 19-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.
- 20-Mouchet J. [DDT and public health]. *Sante*, 1994, 4 (4), 257-62
- 21-Najera JA, Zaim M, 2002. Lutte contre les vecteurs du paludisme; WHO/CDS/WHOPES/5 Rev, 1.
- 22-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. Microbial*. 15. 220-231 p.
- 23-Nikou D, Ranson H, Hemingway J: An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroids-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 2003, 318:91-102.
- 24- 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.
- 25-Padonou GG, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbeto M: Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles*

- gambiae* s.l. in Benin. *Parasit Vectors*. 2012 Apr 10; 5:72. doi: 10.1186/1756-3305-5-72.
- 26- Royal Society of Medicine 48: 295–302.
- 27- Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, Torre AD: Distribution of knockdown resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J* 2008, 7:74.
- 28- Snow R, Rowan K, Greenwood B, 1987. A trial of permethin-treated bed nets in the prevention of malaria in Gambian children. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 563-567.
- 29- 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: 1–7.
- 30- WHO (1976): Manual on practical entomology in malaria. Part II. Geneva; 1975, 45, WHO/CDS/CPC/MAL/9812.
- 31- WHO, 2009. World Malaria Report 2009. World Health Organization, Geneva, 78pp. Site web: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2009/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html).
- 32- WHOPES, 2015. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. *World Health Organization*, Geneva.
- 33- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, et al. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J*. 2010; 9:83.