



REPUBLIQUE DU BENIN

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

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE ZOOLOGIE

RAPPORT DE STAGE

LICENCE EVOLUTION BIODIVERSITE DES ARTHROPODES ET ASSAINISSEMENT

THEME

Application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga

Présenté par :

Nina Edwige Thècle AMATONWE

Sous la supervision de :

Dr Germain Gil PADONOU

Maitre-Assistant des Universités
(CAMES)

Département de Zoologie / FAST

2^{ème} Promotion

Année académique : 2016-2017

Dédicace

A ma fille **Honoriane Marvelli Fifamè AKPOTIN**

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:

- **Professeur Martin C. AKOGBETO**, Coordonnateur 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) et Directeur du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC) pour la confiance que vous nous avez accordée en acceptant de nous accueillir dans votre centre pour notre stage. Professeur, trouvez dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect ;
- Notre maître de stage, **Dr Germain Gil PADONOU**, Enseignant Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques d'Abomey-Calavi. La simplicité, la jovialité et l'amour du travail bien fait dont vous faites preuve ont toujours forcé notre admiration. 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 ces travaux pratiques bien réalisés qui nous font rêver d'être enseignant chercheur. Recevez à travers ce document, toute notre gratitude ;
- Les enseignants chercheurs du CREC que sont, **Dr Razaki OSSE**, **Dr Rock AÏKPON** et **Dr Abdoul Sahabi BIO BANGANA** ;
- Monsieur **Albert SALAKO**, Entomologiste, Doctorant à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), pour votre soutien inestimable et l'appui technique qui ont rendu possible la rédaction de ce mémoire ;
- Messieurs **Aboubakar SIDICK**, **Idelphonse AHOGNI**, **Herman SAGBOHAN**, **Casimir KPANOU**, **Boulais YOVOGAN** et **Wilfrid SEWADE**, pour leur assistance et leur vie de fraternité partagée avec nous ;
- Messieurs **Lazare HOUNKANRIN** et **Issiaka ADELODJOU** pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation des travaux à l'insectarium du CREC ;
- Mes très chers papa **Cyriaque AMATONWE** et maman **Marcelle AGONNOUDE** pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui ;
- Mon bien aimé **Honoré AKPOTIN** ;
- Les membres du Jury, pour avoir accepté d'évaluer notre travail ;
- Le personnel du CREC et tous les étudiants de la 2^{ème} promotion de la LEBA;

- 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...).

Résumé

Les arthropodes sont les animaux les plus nombreux et comportent les principaux vecteurs de maladies. Les populations de la plupart des pays africains dont le Bénin sont affectées par les maladies à transmission vectorielle. L'un des défis majeurs auxquels ces pays font face est le contrôle des vecteurs. C'est ce qui a justifié notre formation dont le stage s'est déroulé au Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC). Cela nous a permis d'appliquer les enseignements théoriques reçus au cours de notre formation et de proposer un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga. Pour atteindre cet objectif, des prospections larvaires seront effectuées dans les communes de Djougou et Copargo suivies de l'élevage des larves à l'insectarium du CREC. Des populations de *Anopheles gambiae* issues des larves seront soumises à des tests de sensibilité OMS pour détecter la résistance phénotypique au bendiocarb, au pirimiphos méthyl, à la perméthrine et à la deltaméthrine. Les espèces du complexe *Anopheles gambiae* seront identifiées par les techniques de PCR, les tests moléculaires et des dosages biochimique seront effectués pour déterminer respectivement les fréquences alléliques *Kdr* et *Ace1* et l'activité des enzymes de détoxification. L'une des recherches en entomologie médicale menées par le CREC a pour objectif d'étudier les facteurs génétiques, biologiques et opérationnels de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme et de développer des stratégies de lutte plus efficaces en zone de résistance. Notre projet de recherche sur l'application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga permettra de choisir l'insecticide candidat pour la prochaine campagne de pulvérisation intra domiciliaire.

Mots clés : Entomologie, Paludisme, *Anopheles gambiae*, Résistance, Donga, Bénin.

Abstract

Arthropods are the highest amount of animals and comprise principal vectors of diseases. Populations of most of African countries like Benin are assigned by vectorial transmission diseases. The control of vectors is one of major challenges to which these countries are facing. This justified our study whose training course has been held at the Entomological Research center of Cotonou (CREC). That enabled us to apply the theoretical lesson received during our study and to suggest a “protocol for the preliminar resistance study of vectors of malaria on insecticides in prelude to an intra-domiciliary pulverization campaign in the department of Donga”. For this purpose, larval prospection were carried out in the communes of Djougou and Copargo, then, larvae were breded in the insectarium of the CREC. Populations of *Anopheles gambiae* resulting from the larvae were submitted to WHO sensitivity test to detect phenotypical resistance respectively to the bendiocarb, the pirimiphos methyl, the permethrine and the deltamethrine. Species of *Anopheles gambiae* were identified by techniques of PCR, molecular tests and biochemical proportionings were carried out respectively to determine the allelic frequencies *Kdr* and *Ace 1* and the activity of the enzymes of detoxification. One of the researches carried out on the field of medical entomology by the CREC aims on the one to study genetic factors, biological and operational resistance to insecticides of vectors of malaria and to develop more effective fight plans in resistance zone. Our research project on insecticides will allow to choice of the candidate insecticide for the next intra domiciliary pulverization campaign.

Keys word: Entomology, malaria, *Anopheles gambiae*, Resistance, Donga, Benin.

Table des matières

Dédicace	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste de sigles et abréviations	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
1. Introduction.....	1
2. Objectif du stage	3
2.1 Objectif général.....	3
2.2 Objectifs spécifiques	3
3. Description du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC)	4
3.1 Cadre physique.....	5
3.2 Personnel.....	8
3.3 Les thématiques de recherche au CREC.....	10
3.4 Activités menées	11
3.4.1 Activités menées à l'insectarium	11
3.4.2 Activités menées sur le terrain.....	12
3.4.3 Activités menées au laboratoire.....	13
3.4.3.2 Test de sensibilité OMS	13
3.4.3.3 Test en cône sur les moustiquaires	14
3.5 Difficultés rencontrées au cours du stage.....	15
4. Application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga	16
4.1 Introduction.....	16
4.2 Synthèse bibliographique.....	17

4.2.1 Biologie de <i>Anopheles gambiae</i>	17
4.2.2 Lutte contre les adultes	18
4.2.3 Principales classes d'insecticides en santé publique	19
4.2.3.1 Les organochlorés.....	19
4.2.3.2 Les Organophosphorés	19
4.2.3.3 Les carbamates	19
4.2.3.4 Les pyréthriinoïdes	20
4.2.4 Mécanismes de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides	20
4.3 Méthodologie.....	20
4.3.1 Zone d'étude	20
4.3.2 Matériel et méthode.....	20
4.3.2.1 Statut de résistance	20
4.3.2.2 Identification des espèces et formes moléculaires au sein du complexe <i>Anopheles gambiae s.l.</i> et caractérisation moléculaire des gènes de résistance <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i>	21
4.4 Résultats attendus.....	21
5. Conclusion	23
6. Références bibliographiques	24

Liste de sigles et abréviations

Ace-I : Acétylcholinestérase

CAME : Centrale d'Achats des Médicaments Essentiels

CREC : Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou

CENATEL : Centre National de Télédétection

SHEA : Section d'Hygiène des Eaux et des Aliments

DDT: Dichloro-Diphényltrichloroéthane

FAST: Faculté des Sciences et Techniques

Kdr: Knock down resistant

LEBA : Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement

MII : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide

MILD : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'action

MS : Ministère de la Santé

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PID : Pulvérisation Intra Domiciliaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

s.l : Sensu lato

SOBEPEC: Société Béninoise des Peintures et Colorants

UAC: Université d'Abomey- Calavi

WHO: World Health Organization

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des travaux à l'insectarium.

Liste des figures

Figure 1 : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou

Figure 2 : Larvarium des moustiques de souche de terrain

Figure 3 : Insectarium des moustiques de la souche de Kisumu

Figure 4 : Animalerie du CREC

Figure 5 : Lapins utilisées pour gorger les moustiques

Figure 6 : Récolte des larves de *Anopheles gambiae s.l* à Djougou

Figure 7 : Test de sensibilité OMS sur les *Anopheles gambiae s.l*

Figure 8 : Test en cône sur les moustiquaires

1. Introduction générale

Le monde animal est constitué d'une multitude d'organismes vivants parmi lesquels les arthropodes sont les plus abondants. Les Arthropodes représentent le plus grand embranchement animal de la planète, ils regroupent plus de 1,5 million d'espèces. Ils sont à l'origine de plusieurs maladies infectieuses ou parasitaires qui occasionnent le tiers des décès annuels dans le monde. 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). Mais, parmi toutes ces affections, le paludisme (du latin *paludis*, "marais") est un des premiers problèmes mondiaux de santé publique et constitue un véritable frein au développement socio-économique (WHO, 2009). Il demeure l'un des fléaux majeurs des pays les plus pauvres de l'Amérique du Sud à l'Asie du Sud-Est, en passant par l'Afrique subsaharienne où surviennent 88% des décès dus à la maladie notamment chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (WHO, 2015).

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.

Le département de zoologie de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) a depuis deux décennies commencé par former des cadres de niveaux supérieurs (docteurs et techniciens de recherches) avec la création de la première formation Master en Entomologie Appliquée (MEA) pour l'étude et la lutte contre les arthropodes. La création en 2016 d'une formation en Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA) à la FAST s'inscrit dans la même logique et vise les mêmes objectifs. Cette formation a pour but de préparer et de former des jeunes capables de : (i) réaliser des études sur les arthropodes, de pouvoir développer des moyens de lutte et de protection contre les arthropodes hématophages (insectes et acariens), vecteurs d'agents pathogènes à l'homme et aux vertébrés, et leur surveillance; (ii) répondre à des questions d'ordre environnemental, qui sont quelques-uns des facteurs de prolifération de ces organismes nuisibles. Plusieurs instituts et centres de recherches participent conjointement à ces formations et à la surveillance de ces vecteurs de maladies. Le Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC), un établissement public dépendant du Ministère de la Santé béninois et

spécialisé dans la recherche sur le paludisme et autres maladies à transmission vectorielles en est un parmi tant d'autres. Ce centre contribue aussi énormément à la formation des cadres entomologistes médicaux nationaux et internationaux. Les principaux axes de recherche développés sont ceux de l'entomologie chargée de la biologie et de la caractérisation des vecteurs du paludisme ; l'étude de la résistance des vecteurs aux insecticides ; l'évaluation de l'efficacité des insecticides et des moustiquaires imprégnées et la parasitologie clinique chargée des essais thérapeutiques.

De Décembre 2017 à Mars 2018, dans l'optique de renforcer nos connaissances acquises au cours de notre formation et de pouvoir nous familiariser au monde professionnel, c'est dans ce centre que nous avons effectué un stage de trois mois. Au cours de ce stage, nous avons effectué plusieurs activités. Dans les lignes qui suivent, 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 : "**Application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga**".

2. Objectifs du stage

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 l'application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga

3. Description du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC)

Le Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC), situé dans le 1^{er} arrondissement de la ville de Cotonou, est spécialisé dans la recherche sur le paludisme. C'est un établissement public dépendant du Ministère de la Santé situé dans la zone industrielle de Cotonou, Akpakpa (PK3). 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 la Section d'Hygiène des Eaux et des Aliments (SHEA) (Figure 1).

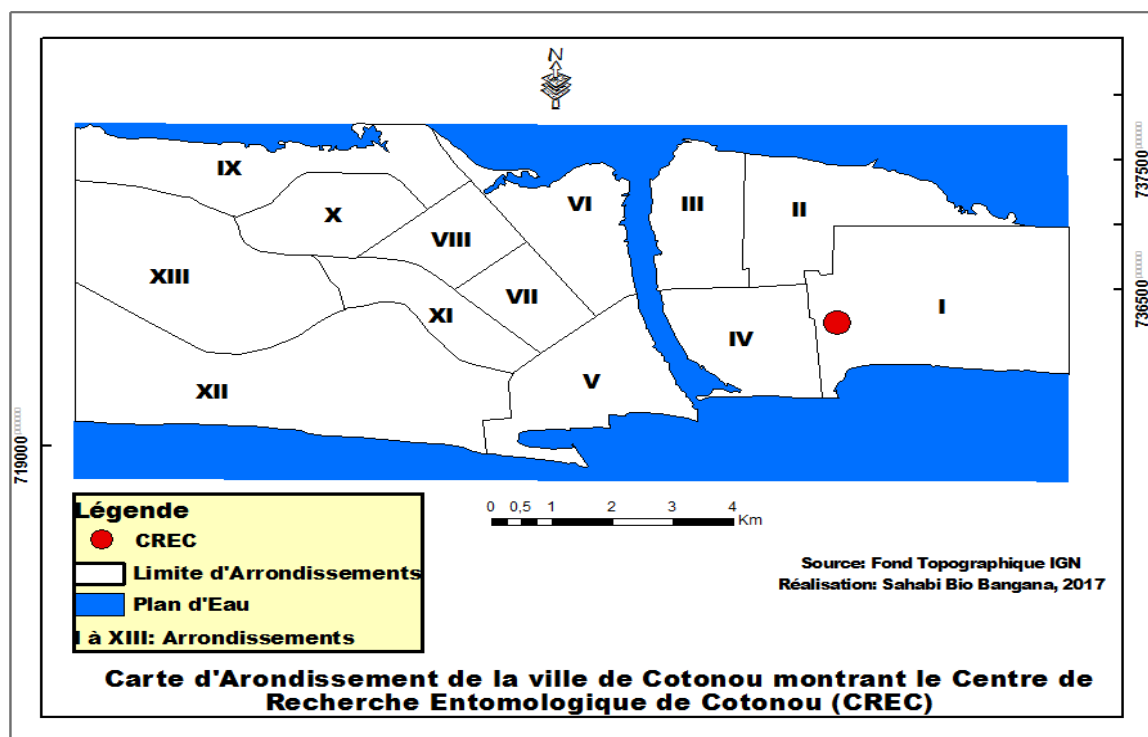


Figure 1 : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou

3.1. Cadre physique

Le CREC est subdivisé en plus de l'administration, en des laboratoires qui offrent des prestations dans le domaine de la lutte anti vectorielle. Au nombre de ces services, nous avons :

➤ **le Laboratoire d'Entomologie Appliquée**

Dans ce laboratoire, les moustiques échantillonnés sont identifiés et séparés morphologiquement avec la clé de détermination de Gilles et Meillon (1968). La technique de la biométrie des palpes est également utilisée pour séparer les vecteurs du paludisme. Ce laboratoire est doté du matériel pour l'identification et la dissection des différentes espèces de moustiques et autres insectes diptères tels que : des aiguilles, des lames, des loupes, des lampes, des pinces et des microscopes pour la lecture de la parturité des moustiques.

➤ **le Laboratoire de biologie moléculaire et de biochimie**

Ce laboratoire s'occupe des tests moléculaires (PCR) et des tests de positivité aux antigènes circum-sporozoitique (Elisa CSP) des vecteurs du paludisme.

➤ **le Laboratoire de contrôle de qualité des outils de lutte anti vectorielle**

Les tests réalisés dans ce laboratoire sont le test en cône et le test en tunnel. Le test en cône consiste en une évaluation, au laboratoire sur des moustiques adultes, de l'efficacité et de la rémanence des supports imprégnés d'insecticides. Quant au test en tunnel, il a pour but d'évaluer l'impact des MIILD sur le comportement des moustiques adultes dans des conditions de laboratoire proches de celles du terrain.

➤ **le Laboratoire de parasitologie**

Ce laboratoire est chargé des essais cliniques. Il évalue la chimio-sensibilité du *Plasmodium falciparum* aux anti-malariques.

➤ **le Laboratoire des tests insecticides**

Ce laboratoire est chargé de réaliser les tests de sensibilité OMS des vecteurs du paludisme aux différentes classes d'insecticides. Le but de ces tests est d'évaluer et de suivre le niveau de sensibilité (ou de résistance) des espèces vectrices aux insecticides.

➤ **l'Insectarium**

L'insectarium est composé de deux blocs. Le premier bloc appelé larvarium (Figure 2) où sont élevées les larves de différentes souches de moustiques (*Anopheles*, *Culex* et *Aedes*). Ce bloc est constitué de deux compartiments A et B munis de lampes incandescentes, de bacs, de voiles, de

levures, de croquettes de chat pour l'élevage des larves et l'incubation des œufs. Le compartiment a accueilli les larves de différents genres de moustiques qui proviennent du terrain (populations sauvages). Le compartiment B reçoit les larves de la souche sensible "Kisumu" originaire du Kenya et la souche "VK-Per" originaire de Bobo-Dioulasso au Burkina-Faso.



Figure 2 : Larvarium des moustiques de souches de terrain

Le second bloc communément appelé insectarium (Figure 3) est aussi 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 des souches sensibles "Kisumu et VK-Per".



Figure 3 : Insectarium des moustiques de la souche Kisumu

L'animalerie (figure 4) s'occupe de l'élevage de petits mammifères rongeurs (lapins, cobayes) et des pigeons sur lesquels les moustiques se gorgent (prise de sang) pour la maturation de leurs ovaires et la ponte (reproduction des moustiques) (Figure 5).



Figure 4 : Animalerie du CREC



Figure 5 : Lapins utilisés pour gorger les moustiques du CREC

3.2. Personnel

Le Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou dispose d'un personnel essentiellement local, avec à sa tête un Directeur et un service administratif et financier entourés 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 :

- **Directeur du CREC** : Professeur **Martin AKOGBETO**, Coordonnateur de la LEBA, Enseignant Chercheur de 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 le Programme National 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 ;
- **Secrétaire** situé au cabinet du Directeur est assuré par Madame **Clémence DURAND** et **Balbine KINDJI**. Elles sont chargées de la gestion des dossiers administratifs ;
- **Personnel administratif et financier** est assuré par Mr **Safiou IDRISOU** assisté par Mme **Francine ZONON**. 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 ;
- **Gardien** : Monsieur **Arouna SALE** ;
- **Responsable du laboratoire de biologie moléculaire et de biochimie** : Dr **Razaki OSSE**, Entomologiste médical, Enseignant Chercheur à Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo. 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 séjour au CREC. Il veille également aux respects des règles d'hygiène au niveau du laboratoire ;
- **Responsable du laboratoire de Contrôle de Qualité** : Monsieur **Idelphonse AHOGNI**, Entomologiste médical et Doctorant à la FAST qui travaille en collaboration avec **Herbert NOUKPO** et **Roland ALIA** Technicien Supérieur d'Analyse Biomédicale. Ce laboratoire assure l'appréciation de l'amélioration de l'efficacité, la rentabilité, la pertinence écologique et la durabilité des méthodes de luttés ;
- **Responsable du laboratoire d'Entomologie Appliquée** : Dr **Germain Gil PADONOU**, Entomologiste médical, Enseignant Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST)

de l'Université d'Abomey-Calavi). Il assure le fonctionnement de ce laboratoire, où les moustiques et autres insectes d'intérêts forensiques sont identifiés et disséqués après leurs captures sur le terrain ;

- **Responsable de l'unité de parasitologie :** Dr **Alain NAHUM**, Médecin et 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;
- **Responsable de l'insectarium :** Mr **Sébastien KOUDENOUKPO**, Technicien supérieur des Laboratoires d'Analyse biomédicale. 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**;
- Trois chauffeurs conducteur administratifs que sont : **Richard OUSSOU ; Faizil KIFOUNI** et **Guy AGBANGLA ;**
- **Enseignants chercheurs :**
 - Dr **Germain Gil PADONOU**, Enseignant Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC);
 - Dr **Razaki OSSE**, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo ;
 - Dr **Rock AIKPON**, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques d'Abomey;
 - Dr **Abdoul Sahabi BIO BANGANA**, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo ;
 - Doctorants **Albert SALAKO, Idelphonse AHOGNI, Come KOUKPO, Arsène FASSINO**U et **André SOMINAHOUN** qui effectuent des travaux de thèse de doctorat au CREC et conduisent les activités de suivi et évaluation des stratégies de lutte anti-vectorielle sous la supervision du Professeur **Martin AKOGBETO**.

3.3. Les thématiques de recherche au CREC

Le CREC travaille actuellement sur plusieurs sujets de recherche au nombre desquels 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,
- variabilité de la transmission du paludisme, de la durabilité et de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides en fonction des faciès éco-géographique en zone de savane et de forêt dégradé au Bénin, Afrique de l'Ouest,
- utilisation des carbamates et des organophosphorés en pulvérisation intra domiciliaire et impact sur la transmission du paludisme et dynamique de la résistance aux insecticides chez *Anopheles gambiae* au Bénin, Afrique de l'Ouest,
- portage des mutations *Kdr* et *Ace-1* et sensibilité des formes moléculaires d'*Anopheles gambiae* aux matériaux imprégnés d'insecticides,
- contrôle de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides en fonction du faciès géographiques en zone de savane au Benin, Afrique de l'Ouest,
- évaluation du niveau de résistance d'*Anopheles gambiae* aux insecticides dans les sites sentinelles sur le transect Nord-Sud du Bénin,
- déterminants environnementaux, bases génétiques de la résistance puis son impact sur l'efficacité des outils de lutte chez les vecteurs du paludisme au Bénin, Afrique de l'Ouest,
- bio-écologie de *Anopheles melas* et son infectivité au *Plasmodium falciparum* dans un milieu côtier lagunaire au sud du Bénin en Afrique de l'Ouest et son état de sensibilité aux insecticides,
- étude des mécanismes de résistance par modification de cible (*Kdr I1014F* et *Ace-1*) et par surexpression des enzymes de détoxification (oxydases, estérases et GST) chez *Anopheles gambiae* et leur impact sur l'efficacité des outils de la lutte anti vectorielle,
- dynamique de transmission de *Plasmodium falciparum* par les populations naturelles de *Anopheles gambiae s.l* et détermination des mécanismes de résistance aux insecticides à Bangui, République Centrafricaine,

- diversité, structure génétiques et résistance de l'espèce *Anopheles gambiae* s.s (*Diptera, Culicidae*) dans un contexte de lutte intégrée au Bénin (Afrique de l'Ouest),
- rôle de l'hétérogénéité écologique et géographique dans la distribution des gènes de résistances aux insecticides chez le principal vecteur du paludisme, *Anopheles gambiae* s.l et les implications pour une lutte efficace contre cette espèce d'insecte,
- évaluation en Phase II de l'efficacité de Clothianidine50 WG, un nouveau produit insecticide à utiliser en pulvérisation intra domiciliaire au Bénin,
- évaluation de l'efficacité et l'effet résiduel de l'insecticide mélange (mélange Clothianidine + Deltaméthrine) en comparaison avec Clothianidine seul et Deltaméthrine seul contre une population d'*Anopheles gambiae* sensible aux Pyréthriinoïdes et une population sauvage résistante dans le traitement de la surface intérieure des murs des habitations dans la commune de Dangbo, Bénin,
- efficacité des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d' Action (MIILD) traitées avec les Synergistes (PBO) sur les populations d'*Anopheles gambiae* à résistance multifactorielles au Bénin,
- adaptation des larves des anophèles vecteurs du paludisme aux gîtes d'eau polluée à Cotonou, Bénin.

3.4. Activités menées

Plusieurs activités ont été réalisées au cours de notre stage. Ces activités ont été menées à l'insectarium, sur le terrain et au laboratoire.

3.4.1. Activités menées à l'insectarium

A l'insectarium, les larves sont triées, séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs étiquetés contenant de l'eau. 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 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. Les activités journalières menées à l'insectarium sont regroupées dans le tableau 1:

Tableau1 : Programme des activités de l'insectarium

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		
Gorger sur le lapin des femelles en reproduction		Gorger sur le lapin des femelles en reproduction		Gorger sur le lapin des femelles en reproduction		
	Mettre les pondoirs		Mettre les pondoirs		Mettre les pondoirs	
	Diviser les larves L1	Mise en eau des pontes		Mise en eau des pontes Diviser les larves L1		Mise en eau des pontes Diviser les larves L1

3.4.2. Activités menées sur le terrain

Nous avons réalisé des prospections larvaires dans la ville de Cotonou et dans les communes de Djougou et Copargo. De telles prospections exigent des spécimens de moustiques âgés de 2 à 5 jours qu'on ne peut obtenir qu'à partir des larves. Ainsi, les larves de *Anopheles gambiae s.l* ont été collectées dans les quartiers de Ladji, Dandji, Fidjrossè, Agla, Djougou et Copargo. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau avec une louche, puis acheminées vers l'insectarium du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC) pour l'élevage (Figure 6).



Figure 6 : Récolte des larves de *Anopheles gambiae s.l* à Djougou

3.4.3. Activités menées au laboratoire

3.4.3.1. Test de sensibilité OMS

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiés comme *Anopheles 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, 2013). Les insecticides suivants ont été testés : la deltaméthrine (0,05%), la perméthrine (0,75%), le bendiocarb (0,1%) et le pirimiphos méthyl 0,25%. 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 de *Anopheles gambiae* utilisées dans cette étude ont été exposées pendant une heure aux papiers imprégnés d'insecticide. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous l'effet de l'insecticide (effet knock-down) au bout de différents intervalles de temps (5, 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) avec un accès libre au jus sucré (jus de miel à 10%). La mortalité au bout de 24 heures a été déterminée selon le protocole de l'OMS (Figure 7).

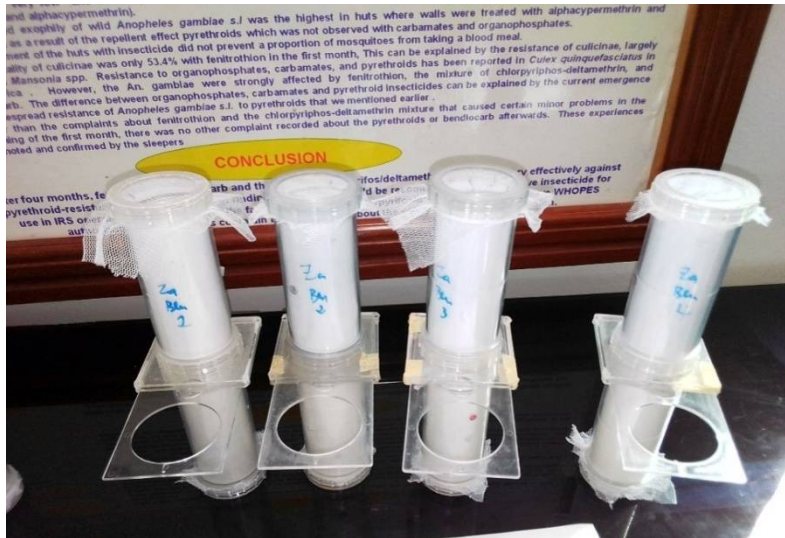


Figure 7 : Test de sensibilité OMS sur les *Anopheles gambiae s.l.*

3.4.3.3. Test en cône sur les moustiquaires

Les cônes standards fournis par l'OMS sont en PolyVinyl-Chloride (PVC). Les moustiques ont des difficultés à se poser sur cette matière. Mais ils reposent relativement le fragment de moustiquaire sur lequel est posé le cône. On a l'assurance que les tarse du moustique sont uniquement en contact avec les fibres traitées. On place le fragment de moustiquaire (surface : 0,25 m x 0,25 m soit 0,0625 m²) entre deux plaques de Plexiglas transparent comportant quatre trous à l'emplacement exact où doivent se trouver les cônes. Ce dispositif est fixé grâce à 4 pinces "double clips" et maintenu obliquement à 40° pour une bonne observation sur un support en grillage métallique ou en bois recouvert. L'orifice des cônes est fermé à l'aide d'un bouchon en polyéthylène sur lequel les moustiques ne peuvent pas se poser. Quatre tests en cône sont réalisés pour chaque moustiquaire. Des moustiques femelles sont sélectionnés et partagés par lot de 5 dans chacun des cônes. Les moustiques sont laissés en contact de la moustiquaire pendant 3 minutes puis retirés et mis dans quatre gobelets correspondants chacun aux lots de moustique de chaque cône. Ils sont ensuite alimentés au jus sucré (solution de saccharose à 10%). Les gobelets sont soigneusement conservés sur un portoir dans une salle à une température de 25°C et une hygrométrie de 20% à la fin des bio essais. La mortalité des moustiques est lue 24 heures après la manipulation (WHO, 2011) (Figure 8).



Figure 8 : Test en cône sur les moustiques

3.5. Difficultés rencontrées au cours du stage

Au cours de notre stage au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou nous avons eu à rencontrer plusieurs difficultés à savoir :

- La plupart des articles scientifiques que nous avons exploités sont écrits en anglais ce qui nous a rendu la tâche parfois difficile ;
- 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 ;
- Difficultés de travail dû aux coupures intempestives de l'énergie électrique. Les coupures de l'énergie électrique rendent difficiles les travaux au laboratoire, ce qui entraîne parfois la reprise complète des manipulations, des dommages des appareils de travail (ordinateur).

4. Application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga

4.1. Introduction

Le contrôle des vecteurs du paludisme repose essentiellement sur deux outils efficaces et primordiaux : les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD) et la Pulvérisation intra domiciliaire d'Insecticide (PID) (Curtis *et al.*, 1999 ; Chavasse *et al.*, 1999). Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses initiatives internationales se sont mobilisées autour de ces stratégies de lutte anti vectorielle. Des avancées impressionnantes ont été notées dans la lutte contre le paludisme. Ainsi, en Afrique subsaharienne, sur les 663 millions de cas évités par le biais des interventions antipaludiques entre les années 2000 et 2015, 69 % l'ont été grâce à l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) et 10 % grâce aux pulvérisations intra domiciliaires d'insecticides à effet rémanent (PID). De même, au Bénin, les campagnes de pulvérisations intra domiciliaires ont contribué à une réduction drastique et significative de la transmission du paludisme dans l'Ouémé (de 2008 à 2010) et dans l'Atacora (de 2011 à 2015) (Akogbéto *et al.*, 2011 ; Ossè *et al.*, 2012 ; Akogbéto *et al.*, 2015). Mais devant ces importants succès, d'importants défis restent à relever. Au regard du plan stratégique 2016-2030 de l'OMS et devant ces succès enregistrés dans la lutte contre le paludisme, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a donc inscrit dans son agenda de continuer les distributions massives et universelles de Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MIILD) et d'étendre les Pulvérisations intra-Domiciliaires d'Insecticides à effet rémanent (PID). Ces différentes stratégies sont basées sur l'utilisation d'insecticides : les moustiquaires sont imprégnées de pyréthriinoïdes et les campagnes PID sont basées sur l'utilisation des non-pyréthriinoïdes (organophosphorés et carbamates). Le département de la Donga a été choisi pour cette extension de la PID. Mais, il est inutile de se lancer dans la mise en œuvre d'une intervention de lutte anti vectorielle basée sur l'utilisation de produits chimiques sans avoir au préalable certaines informations de base sur la sensibilité des vecteurs de la zone ciblée aux différentes classes insecticides. Dans le contexte actuel où la résistance est généralisée aux pyréthriinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires, la présente étude recherchera d'autres alternatives pour pallier à ce phénomène. De même cette surveillance entomologique sera pour le PNLN un élément clé pour renseigner sur les insecticides candidats potentiels pour la PID dans le département de la Donga. C'est dans ce contexte que l'étude intitulée « **Application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans le département de la Donga** » sera réalisée.

De façon générale, cette étude vise à recueillir des données de base entomologiques sur le niveau de sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides dans la zone d'extension de la PID (Donga) au Bénin. Pour y arriver des objectifs spécifiques ont été définis.

Il s'agit de :

- Evaluer le niveau de sensibilité de la population de *Anopheles gambiae s.l* aux différentes classes d'insecticides (organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes) ;
- Etudier les différents mécanismes de résistance des vecteurs dans la zone d'extension PID (Donga) au Bénin.

Pour atteindre ces objectifs les hypothèses ci-après ont été formulées :

- La population de *Anopheles gambiae s.l* de la Donga est sensible aux pirimiphos méthyl (Organophosphorés) et aux bendiocarb (carbamates) mais résistantes aux pyréthriinoïdes (perméthrine et deltaméthrine) ;
- La mutation *kdr* est le principal mécanisme de résistance détecté chez *Anopheles gambiae s.l*.

4.2. Synthèse bibliographique

4.2.1. Biologie de *Anopheles. gambiae*

Les Anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement comporte deux phases :

- La première est aquatique et concerne les stades pré-imaginaux (œuf, larves, 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 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 pendant 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.

4.2.2. Lutte contre les adultes

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

La pulvérisation (ou aspersion) intra domiciliaire (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, 2002). 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 (Mac Donald, 1956 ; Gilles et de Meillon, 1968). 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 pour toutes les zones d'endémie. Elle a contribué à baisser de façon drastique la transmission du Paludisme en Guinée équatorial et au Bénin dans le département de l'Ouémé (Padonou et al, 2012). En combinaison avec l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée d'action, son action est efficace (Akogbéto et al, 2015) pour la lutte anti vectorielle. Mais 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 les cultures essentielles pour l'économie locale.

4.2.3. Principales classes d'insecticides en santé publique

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

4.2.3.1. 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 et al., 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. Tout comme le DDT, le lindane est également interdit d'utilisation dans les produits anti moustiques car ils sont des polluants organiques persistants.

4.2.3.2. 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 chlorpyrifos comme larvicides ou imagocides en aspersion intra-domiciliaires (Mouchet et al., 1991). Les formes oxydées des organophosphorés 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 et al., 1996).

4.2.3.3. 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 et al., 1996). Mais l'inhibition est plus rapidement réversible dans le cas des carbamates que dans le cas des organophosphorés. C'est à la famille des carbamates qu'appartient le bendiocarb, un insecticide en usage en pulvérisation intra domiciliaire au Bénin depuis 2008.

4.2.3.4. 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.

4.2.4. Mécanismes de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides

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.

4.3. Méthodologie

4.3. 1. Zone d'étude

L'étude sera menée dans deux communes (Djougou et Copargo) dans le département de la Donga.

4.3. 2. Matériel et méthodes

4.3. 2.1. Statut de résistance

Des prospections larvaires seront réalisées dans les communes de Djougou et Copargo dans la Donga. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes seront prélevées à la surface de l'eau avec une louche, puis acheminées vers l'insectarium du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou

(CREC) pour l'élevage. Les larves et nymphes seront élevées jusqu'au stade adulte. Les femelles adultes de 2 à 5 jours seront isolées pour être soumises respectivement aux papiers imprégnés de pirimiphos méthyl (0,05%) (Organophosphorés), bendiocarb (0,1%) (Carbamates), perméthrine (0,75%) et deltaméthrine (0,05%) (Pyréthroïdes) pendant 1 heure. 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 (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) d'expositions 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%). La mortalité au bout de 24 heures sera déterminée selon le protocole de l'OMS.

Le taux de mortalité sera estimé à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\text{Taux de mortalité}(\%) = \frac{\text{Nombre d'individus mort}}{\text{Nombre d'individus testés}} \times 100$$

Le statut de résistance des moustiques testés sera déterminé selon les critères de l'OMS (WHO, 2013): toute population de *Anopheles 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 suspicion de résistance à confirmer ; lorsque la mortalité est inférieure à 90%, la population est considérée comme résistante.

4.3.2.2. Identification des espèces et formes moléculaires au sein du complexe *Anopheles 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. Les femelles d'anophèles seront analysées à la PCR selon le protocole de Scott *et al.*, (1993) pour la détermination des différentes espèces d'*Anopheles gambiae s.l.*, et pour l'identification des différentes formes moléculaires M et S de *Anopheles 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. Résultats attendus

Les résultats escomptés à la fin de cette étude sont :

- Le statut de résistance (sensibilité/résistance aux différentes classes d'insecticides) d'*Anopheles gambiae s.l* dans les communes de Djougou et Copargo est disponible.
- Les principaux mécanismes de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, et les fréquences des gènes ***Kdr*** et ***Ace-1*** sont des données disponibles.

5. Conclusion

Le stage effectué au Centre de Recherches Entomologiques 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'application d'un protocole pour l'étude de la résistance des vecteurs du paludisme en prélude à une campagne de PID dans la Donga permettra une meilleure connaissance du statut de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et le choix de l'insecticide candidat potentiel pour la prochaine campagne PID.

6- Références bibliographiques

1. Akogbeto C M. 1992. Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin. Thèse de doctorat. Paris 11, 194p.
2. Akogbeto M, Chippaux J P et Coluzzi M. 1992. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin) : étude entomologique. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 40 : 233–239.
3. Akogbeto M., Padonou G. G., Bankole H.S., Gazard D.K. et Gbedjissi G.L. 2011. Dramatic Decrease in Malaria Transmission after Large-Scale Indoor Residual Spraying with Bendiocarb in Benin, an Area of High Resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*, 85(4), 586-93.
4. Akogbeto M, Agbanrin R, Padonou G G, Yadouleton A, Attolou R, Badirou K, Govoetchan R, Gnanguenon V, Sovi A et Anagonou R. 2015: Abundance and diversity of culicidae fauna at cotonou in southern benin abundance and diversity of culicidae fauna at cotonou in southern benin abundance and diversity of culicidae fauna at cotonou in southern benin. *International Journal of Current Research* , 7:14085–14091.
5. Anthony N M, Benner E A, Rauh J J, Sattelle D B, 1991. GABA receptors of insects susceptible and resistant to cyclodiene insecticides. *Pesticide Science*, 33 : 223–230.
6. Atieli F K, Munga S O, Ofulla A V, Vulule J M, 2010. The effect of repeated washing of long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) on the feeding success and survival rates of *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 9 : 304.
7. Ayad H, Georghiou P, 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Journal of Economic Entomology*, 68 : 295–297.
8. Brooke B D, Hunt R H, Matambo T S, Koekemoer L L, Van Wyk P, Coetzee M, 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Medical and Veterinary Entomology*, 20 : 294–299.
9. Busvine J S R, Pal R, 1969. Conséquences de la résistance aux insecticides pour la lutte contre les vecteurs et les maladies qu'ils transmettent. *Bulletin of the World Health Organization*, 40(5) : 731–744.
10. Bourguet D, Raymond M, Fournier D, Malcolm C A, Toutant J P et Arpagaus M, 1996. Existence of two Acetylcholinesterases in the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Neurochemistry*, 67 : 2115-2123
11. Carnevale P, Robert V, 2009. Les anophèles biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD, Marseille, 391p.

12. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P, 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiaesensulato*. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (3) :230-234.
13. Chavasse D C, Shier R P, Murphy O A, Huttly S R, Cousens S N, Akhtar T, 1999. Impact of fly control on childhood diarrhoea in Pakistan: community-randomised trial. *Lancet*, 353(9146) :22-25.
14. Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco M A, 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 483–497.
15. Curtis N J, Ringo J M, Dowse H B, 1999. Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Journal of morphology*, 240 : 225-235.
16. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabiré R K, Hougard J M, Akogbeto 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
17. Favia G, Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N, Touré Y T, 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.
18. Gil Germain Padonou, 2012 Thèse de Doctorat, Contrôle de *Anopheles gambiae* (Diptera, Nematocera, Culicidae), vecteur du paludisme, par le bendiocarb en pulvérisation intradomiciliaire à grande échelle dans le département de l'Ouémé au Bénin P : 33-35 ; 44-65
19. Gilles M T, Meillon B, 1968. The *Anophelinae* of Africa South of Sahara Ethiopian Zoogeographical Region, 2nd edn, no. 54. *Publication of South African Institute for Medical Research, Johannesburg*, 343 p
20. Gillies M, Coetzee M, 1987. A supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. *Publication of South Africa Institut MedicalResearch*, 55 : 143.
21. Govoetchan R, Gnanguenon V, Ogouwalé E, Oké-Agbo F, Azondékon R, Sovi A, Attolou R, 2014. Dry season refugia for anopheline larvae and mapping of the seasonal distribution in mosquito larval habitats in Kandi, northeastern Benin. *Parasites & Vectors*, 7 : 137.
22. Luxemburger C W, Perea A G, Delmas C, Pruja B, Pecoul A, Moren A, 1994. Permethrin-impregnated bed nets for the prevention of malaria in schoolchildren on the Thai-Burmese border. *Transaction of Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene*, 88 (2): 155-159.

23. Martinez R E, Caballero M J, Gándara B, Rogel M A, Lopez A M, Wang E T, Fuentes-Ramirez LE, Toledo I, Martinez L, Hernandez L I, Martinez R J. 1998 Ecological, phylogenetic and taxonomic remarks on diazotrophs and related genera. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 38 : 155-160
24. Mac Donald G. 1956. Epidemiological basis of malaria control-Bull. *Org Mond Santé*, 15 : 613-626.
25. Mouchet J, Elissa N, Rivière F, Meunier JY, Yao K.1994. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*,
26. Mouchet J, Robert V, Carnevale P, Ravaonjanahary C, Coosemans M, Fontenille D et Lochouart L.1991. Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale: place et limite de la lutte antivectorielle. *Cah D'études Rech Francoph Santé*, 1:277–288.
27. Najera J A, Zaim M, 2002. Lutte contre les vecteurs du paludisme ; WHO/CDS/WHOPES/5 Rev, 1.
28. OMS, 1973. Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle, 17^e rapport OMS d'Experts des insecticides, *Organisation mondiale de la Santé*.
29. OMS, 2013. Le Rapport sur le Paludisme en Afrique. *Organisation mondiale de la Santé/UNICEF*, 120 pp
30. Ossè R, Gnanguenon V, Sèzonlin M, Aikpon R, Padonou G, Yadouleton A, Akogbeton M. 2012 :Relationship between the presence of kdr and Ace-1 mutations and the infection with *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s. in Benin. J. November 2012. *Parasitol Vector Biol* , 4:3139
31. Ossè R, Aikpon R, Padonou GG ,Oussou O, Yadouléton A and Akogbéto M 2012 Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign
32. Padonou G, Gbedjissi G, Yadouleton A, Azondekon R, Ossé R, Oussou O, Gnanguenon V, Aikpon R, Sezonlin M, Akogbeton M, 2012 Decreased proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae* s.l. populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa) *Parasites & Vectors* 2012, 5:262 doi:10.1186/1756-3305-5-26
33. PNLP, 2006. Plan stratégique de lutte contre le paludisme au Bénin 2006-2010. Disponible sur : <http://www.rollbackmalaria.org/countryaction/nsp/benin.pdf>
34. Raymond M, Fournier D, Bride J M, Cuany A, Berge J M, Magnin NP, 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive

- acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology*, 79 : 1452–1458.
35. Rodhain F, Pérez C, 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, *Notion d'épidémiologie des maladies à vecteurs*. Ed Maloine, 152p.
36. Robert V, Carnevale P, Mouchet J, 1988. Pyrethroid-impregnated bed nets in the malaria control strategy at community level. *Acta tropica*, 46 : 267-268.
37. Scott J A, Brogdon W G et Collins F H, 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(4) :520-9.
38. 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 Medecine and Hygiene*, 81 : 563-567.
39. Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Comparative genomics : insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423 : 136–137.
40. 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.
41. WHO. 2006. Paludisme : lutte anti vectorielle et protection individuelle : rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS. *Organisation mondiale de la Santé*, Genève.
42. WHO. 1976. 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.
43. 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.
44. WHO. 2010 World Malaria Report.
45. WHO. 2011 World Malaria Report.
46. WHO. 2013 World Malaria Report.
47. WHOPES, 2015. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. *World Health Organization*, Geneva.