



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

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

**RAPPORT DE STAGE**

Thème :

**Etude de l'évolution du taux de mortalité des populations sauvages de *Anopheles gambiae* résistantes au Bénin en fonction du temps d'exposition aux moustiquaires imprégnées d'insecticide**

Présenté par :

**Rolande ASSOGBA**

Sous la direction de :

**Docteur Armel DJENONTIN**

Maître-Assistant des Universités du CAMES  
Enseignant-Chercheur au Département de Zoologie

2<sup>ème</sup> Promotion

Année académique 2016-2017

## **Remerciements**

Au terme de ce travail, je me dois de remercier tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à son bon déroulement.

Je tiens à remercier le Professeur Martin AKOGBETO, Enseignant-Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Directeur du Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC) pour avoir accepté m'accueillir au CREC pour le stage.

Je remercie le Docteur Armel DJENONTIN, Enseignant-Chercheur à la FAST, mon Directeur de mémoire, pour ses conseils, ses encouragements et sa disponibilité qui m'ont été d'un grand intérêt.

Je remercie également Messieurs Aziz BOURAÏMA, Christophe SOARES, techniciens de laboratoire au CREC, feu Edmond FAKORODE, Assistant-Technicien au CREC et Monsieur Sébastien KOUDENOUKPO, Responsable des insectariums du CREC pour avoir guidé mes pas au cours du stage.

Je tiens à remercier, ma maman Marguélite ZANHOUNDAHO et ma grande sœur Gracienne ASSOGBA pour avoir contribué financièrement à cette étude, Gildas DJIDOHOKPIN pour m'avoir orienté et soutenu dans cette étude et mon feu papa Nazaire ASSOGBA qui a cultivé en moi avant sa mort les vertus de la tolérance et de l'amour du prochain sur fond de tendresse et d'affinité.

## **Résumé**

Les moustiquaires imprégnées sont les principaux moyens de lutte contre le paludisme. Malheureusement, l'efficacité de ces moustiquaires imprégnées d'insecticides diminue au fil du temps du fait de la résistance des moustiques aux insecticides utilisés pour l'imprégnation des dites moustiquaires. Selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une moustiquaire est efficace si après 3 minutes d'exposition le taux de knock-down (effet choc) des moustiques est supérieur ou égal à 95% après 60 minutes ou si le taux de mortalité de ces moustiques est supérieur ou égal à 80%. Dans ce rapport de stage, nous avons proposé le thème de recherche "Etude de l'évolution du taux de mortalité des populations sauvages *Anopheles gambiae* résistantes au Bénin en fonction du temps d'exposition aux moustiquaires imprégnées d'insecticide" qui vise à déterminer si le temps d'exposition des moustiques résistants aux insecticides influence leur taux de mortalité. A cet effet, des prospections larvaires seront réalisées dans plusieurs communes du Bénin. Des tests en cône seront effectués avec des temps d'exposition variables allant de 3 minutes à 2 h (3 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 1 heure 30 minutes et 2 heures). Au bout de 24h, les moustiques morts et vivants seront décomptés et les mortalités observées pour chaque temps d'exposition seront enregistrées.

**Mots-clés** : Paludisme, *Anopheles gambiae*, résistance, insecticide, moustiquaire imprégnée.

## **Summary**

Impregnated mosquito nets are the main ways to fight against malaria. Unfortunately, the efficiency of these impregnated mosquito nets decreases progressively due to the resistance of mosquitoes toward insecticides used for nets impregnation. According to the criteria of the World Health Organization, mosquito net is efficient whether after 3 minutes of its exposition the knock-down rate of mosquitoes is upper or equal to 95 % or after 60 minutes the mosquitoes mortality rate is upper or equal to 80 %. In the current training report, we have proposed as topic “Study of mortality rate progression of *Anopheles gambiae* wild populations resisting in Benin in relation to exposition time to insecticide impregnated mosquito nets” that aims to determine whether the exposition time of insecticide resistant mosquitoes influence their mortality rate. For this purpose, larval prospection will be carried out in many commons of Benin. Some cone tests will be done with variable exposition times from 3 minutes to 2 hours (3 minutes, 15minutes, 1hour ,1 hour30 minutes and 2 hours). In 24 hours, dead and live mosquitoes will be counted and mortality observed for each exposition time will be recorded.

**Keywords:** Malaria, *Anopheles gambiae*, resistance, insecticide, impregnated mosquito net.

## **Liste des sigles et abréviations**

**An:** *Anopheles*

**ADN :** Acide Désoxyriboses Nucléique

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

**CERPAGE :** Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'enfant

**EDTA :** Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique

**FAST :** Faculté des Sciences et Techniques

**FSA :** Faculté des Sciences Agronomique

**GABA :** Gamma-Aminobutyric acid

**IRCB :** Institut de Recherche Clinique du Bénin

**Kdr :** Nom du gène codant la pour mutation du Knockdown resistance

**NaCl :** Chlorure de Sodium

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**PCR :** Réaction de Polymérisation en Chaîne

**SDS :** Sodium dodecyl sulfate

**UAC :** Université d'Abomey-Calavi

## **Liste des figures**

**Figure 1** : Pondoir

**Figure 2** : Tri de nymphes

**Figure 3** : Tubes à OMS

**Figure 4** : Cônes OMS

**Figure 5** : Préparation du test en tunnel

**Figure 6** : Dissection de l'ovaire à la loupe

**Figure 7** : Broyage de moustiques

**Figure 8** : *Anopheles gambiae*

## **Tables des matières**

<b>Remerciements.....</b>	<b>1</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>2</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des sigles et abréviation.....</b>	<b>4</b>
<b>Listes des figures.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Objectif du stage.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Description du lieu de stage.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Cadre physique.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Cadre personnel.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3. Thématiques de recherche du lieu de stage.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4. Activités menées .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.1. Prospection larvaire et élevage des moustiques.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4.2. Tests de sensibilité.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4.3 Tests d'efficacités.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4.4. Dissection des ovaires de femelles de moustiques et détermination de la parité... 15</b>	
<b>3.4.5 Extraction de l'ADN des moustiques.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Difficultés rencontrées.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Choix d'un sujet de recherche.....</b>	<b>18</b>
<b>5.1. Introduction.....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. Synthèse bibliographique.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2.1 Vecteurs du paludisme.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2.2 Résistance des vecteurs aux insecticides.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2.2.1 Définition de résistance.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2.2.2 Différents mécanismes de résistance.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2.3. Moustiquaire imprégnée.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Méthodologie.....</b>	<b>23</b>
<b>6.1 Cadre d'étude.....</b>	<b>23</b>
<b>6.2 Méthode d'étude.....</b>	<b>23</b>
<b>7. Résultats attendus.....</b>	<b>23</b>

<b>8. Conclusions.....</b>	<b>23</b>
<b>9. Références.....</b>	<b>25</b>

## **1. Introduction**

Les activités pédagogiques de la formation Licence Evolution, Biodiversité des Arthropodes et Assainissement (LEBA) sont appuyées par un stage en milieu professionnel ou dans un laboratoire de recherche. Pour notre stage, nous avons séjourné dans une des équipes de recherche de l'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sise à Abomey-Calavi. La fin de notre stage est sanctionnée par ce rapport qui se présente en deux parties. Dans un premier temps, nous présenterons le compte rendu des activités que nous avons menées et dans un second temps, nous présenterons notre thème de recherche sur lequel nous avons réfléchi au cours du stage.

## **2. Objectif du stage**

L'objectif du stage que nous avons effectué est de nous amener à nous familiariser avec les réalités du monde professionnel dans une équipe de recherche et à nous approprier des techniques utilisées dans ladite équipe.

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

Notre lieu de stage est l'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sise à Abomey-Calavi.

### **3.1. Cadre physique**

L'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sise à Abomey-Calavi est limitée au Nord par le quartier Zopa, au Sud par le Quartier Zoca, à l'Est par la Cité Arconville et à l'Ouest par le Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) d'Abomey-Calavi. Sur le site abritant l'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), il y a 4 bâtiments dont deux hébergent l'Institut de Recherche Clinique du Benin (IRCB) et le Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfant (CERPAGE). Les équipes de recherche du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) occupent un bâtiment et un quatrième bâtiment sert d'insectarium. En plus de ces bâtiments nous avons un local réservé à l'animalerie.

A l'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou travaillent deux équipes de recherche. Il s'agit de l'équipe de Parasitologie Clinique et celle d'Entomologie Médicale. C'est dans cette dernière équipe que nous avons effectué notre stage. Cette équipe dispose de :

- ✓ un laboratoire de test insecticide,

- ✓ un laboratoire de test de biochimie et de protéomie,
- ✓ un laboratoire pour la biologie moléculaire
- ✓ un bureau des chercheurs
- ✓ un bureau des thésards
- ✓ une salle pour les étudiants et les techniciens
- ✓ un secrétariat

### **3.2. Personnel**

Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou est dirigé par le Professeur Martin AKOGBETO. L'équipe dans laquelle nous avons travaillé au cours de notre stage est composée de :

- Docteur Arnel DJENONTIN, Enseignant-Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques et Chercheur Associé au CREC;
- Daleb ABDOULAYE, Doctorant en Anthropologie;
- Oriane AÏCHEOU (remplacée ensuite par Anita HOUNMASSE), Secrétaire;
- Sébastien KOUDENOUKPO, Responsable de l'insectarium
- Aziz BOURAÏMA, Technicien de laboratoire;
- Christophe SOARES, Technicien de laboratoire;
- Feu Edmond FAKORODE, Assistant-Technicien.

### **3.3. Thématiques de recherche du lieu de stage**

L'équipe avec qui nous avons effectué notre stage travaille sur plusieurs sujets de recherche dont :

- L'étude de l'influence de la bio-écologie sur la sélection et la propagation de résistance chez les vecteurs du paludisme dans le Département de l'Ouémé (Communes de Misséréfé, Bonou et Sèmé);
- L'évaluation de la durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticide (Lifenet) dans la Commune de Tori Bossito pour la lutte contre le paludisme;

### **3.4. Activités menées**

Dans le cadre des études menées par l'équipe qui nous a accueillis, nous avons effectué plusieurs activités avec ladite équipe. Il s'agit des prospections larvaires, de l'élevage des moustiques, des tests de sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides, des tests

d'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide, la dissection des ovaires de femelles de moustiques et l'extraction de l'ADN des moustiques en vue de la réalisation d'analyses de biologie moléculaire.

### **3.4.1. Prospection larvaire et élevage des moustiques**

Les prospections Larvaires permettent de collecter des moustiques sauvages en vue de réaliser sur ces moustiques divers tests dont les tests de sensibilité aux insecticides. Les prospections larvaires consistent à repérer des gîtes larvaires de moustiques et à prélever une partie de l'eau de ces gîtes contenant des larves de moustiques de différents stades. Dans le cadre de notre stage, nous avons réalisé des prospections larvaires dans les Communes de Misséré, de Bonou et de Sémé (Département de l'Ouémé, Bénin). Les larves et les nymphes ont été collectées dans plusieurs gîtes. Les larves ramenées du terrain ont été triées par stades larvaires et conservées dans des bacs en plastique contenant de l'eau de robinet déchlorée. A l'insectarium nous avons fait l'élevage de différentes souches de moustiques *Anopheles gambiae*. Il s'agit de la souche sensible Kisumu et des souches résistantes Kis-kdr, Acer-Kis et VK-per. Les moustiques adultes sont mis dans une cage cubique, déposée dans une salle climatisée à  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  puis gorgés de sang de lapin pendant 20 minutes en vue d'assurer leur reproduction. Des pondoirs sont placés dans chacune des cages après le repas sanguin des moustiques pour recueillir les œufs (figure 1). Cinq jours après, les pondoirs sont retirés puis on procède à la mise en eau des œufs. Ils éclosent après quelques heures. Les larves issues des éclosions sont réparties en moyenne par lot de 100 larves par bacs pour optimiser non seulement leur croissance mais aussi pour éviter le cannibalisme. Les larves sont nourries avec des croquettes de chat (5 grammes de croquettes de chat mélangés dans un bac de 500 ml d'eau de robinet pour 80 larves). Chaque bac est recouvert de toile moustiquaire. Les bacs sont rangés l'un après l'autre sur un portoir de grande capacité dans une salle dont la température est comprise entre 25 et  $30^{\circ}\text{C}$ . Cette température est maintenue à l'aide d'un radiateur qui diffuse la chaleur par rayonnement. Ces larves nymphosent après environ une semaine après la mise en eau. Les nymphes sont triées chaque jour et sont mises dans une autre cage cubique pour l'émergence des adultes quelques heures après (figure 2). Les adultes issus de l'émergence seront nourris au jus de miel (10%). Ces moustiques sont destinés pour les tests de bio essai au laboratoire d'une part et pour la reproduction de la souche (si les moustiques sont âgés) d'autre part.



**Figure 1 :** Photographie montrant un pondoir  
Source : Rolande Assogba, 2018



**Figure 2 :** Photographie montrant le tri de nymphes  
Source : Rolande Assogba, 2018

### 3.4.2. Tests de sensibilité

Les tests de sensibilité sont effectués pour déterminer la proportion de la population de vecteurs qui est physiologiquement résistante à un insecticide particulier. Le test en tube OMS est l'un de ces tests qui a pour but d'évaluer et de suivre sur des moustiques adultes le niveau de sensibilité à un insecticide (mesure de la résistance). Ce type de test permet également de comparer l'efficacité de différents insecticides vis-à-vis d'une espèce donnée ou inversement la sensibilité de plusieurs espèces de moustique vis à vis d'un insecticide donné. Les résultats s'expriment en pourcentage de taux de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un

pyréthrianoïde, en termes de taux de mortalité et taux de Knock Down (effet KD). Il permet également de déterminer la dose diagnostique nécessaire pour l'évaluation de la résistance des moustiques sur le terrain. Ainsi pour réaliser ce test il faut préparer dans un premier temps quatre tubes par concentration plus les témoins. Un papier filtre neutre est placée dans les tubes maintenus par deux bagues argentées, l'une des extrémités est fermée avec un bouchon et l'autre par un tiroir. Ensuite, 25 moustiques femelles sont prélevés directement dans la cage au moyen d'un aspirateur à bouche et introduits délicatement dans les tubes OMS sans les traumatiser (figure3). Les moustiques sont mis en observation pendant 1 heure dans les tubes d'observation (verts) avec une température comprise entre 26 °C et 28°C et l'humidité relative entre 80 et 100 %. Dans un second temps les papiers imprégnés d'insecticide sont placés dans les tubes d'exposition (rouges) face imprégnée à l'intérieur (données lisibles à travers le tube). Chaque tube d'exposition est vissé sur le tiroir du tube d'observation ; ensuite la plaque est coulissée de manière à dégager entièrement l'ouverture et les moustiques sont soufflés doucement du tube d'observation vers le tube d'exposition. les tubes d'expositions sont laissés en position verticale, tamis en haut pendant 1 heure sous un éclairage diffus modéré et le nombre de knock-down (KD) est noté à intervalles réguliers si besoin. A la fin de la période d'exposition, les moustiques sont glissés dans les tubes d'observations de la manière que précédemment et nourris au jus sucré puis les tubes d'observation sont conservés en position verticale pendant 24 heures. Après 24 heures, le nombre de moustique morts est compté.

Pour que le test soit validé la mortalité dans les tubes témoins doit être inférieure à 20% si celle-ci est comprise entre 5 et 20% la mortalité est corrigée selon la formule d'Abbott :

Mortalité corrigée =  $\frac{\% \text{ mortalité traité} - \% \text{ mortalité témoin}}{100 - \% \text{ mortalité témoin}} \times 100$

100 - %mortalité témoin



**Figure 3** : Photographie montrant des tubes OMS

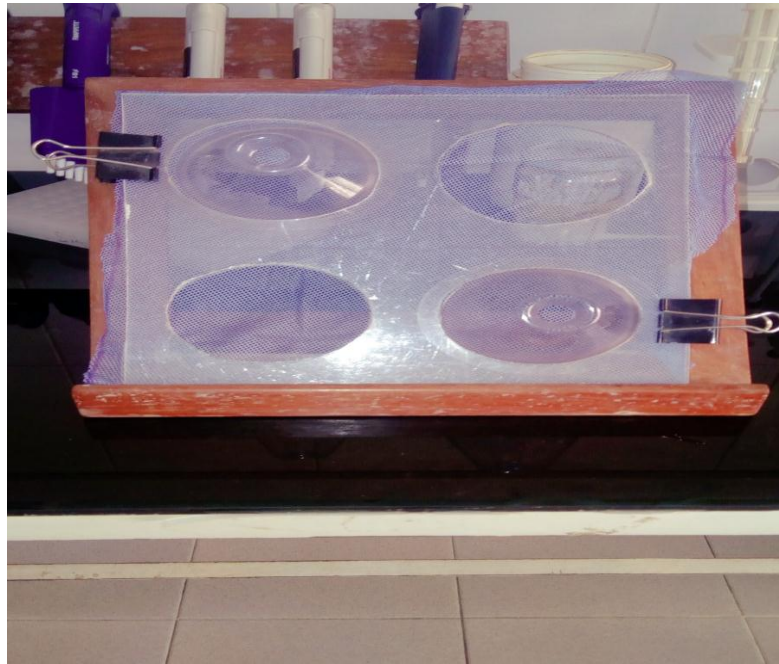
Source : Rolande Assogba, 2018

### 3.4.3. Tests d'efficacité

L'efficacité résiduelle d'un insecticide sur une surface traitée est déterminée par des tests d'efficacité biologique. Parmi ces tests nous avons le test en cône et le test en tunnel.

#### *Test en cône*

Le test en cône a pour but d'évaluer au laboratoire et sur des moustiques adultes l'efficacité et la rémanence d'un insecticide sur un substrat donné : tissu, tulle moustiquaire, terre, bois, etc. C'est également un outil approprié pour tester la résistance au lavage de formulations insecticides sur différents types de substrats en tissu. Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un pyréthrianoïde, en termes de pourcentage de mortalité et d'effet Knock Down (effet KD). Cette évaluation simultanée du KD et de la mortalité permet ainsi d'apprécier la bio-disponibilité de l'insecticide sur le substrat. Le temps d'exposition des moustiques (à jeun et âgés de 2 à 5 jours, généralement femelles) est selon les supports. Il est de 3 minutes pour les moustiquaires avec 5 individus dans des cônes standardisés par l'OMS et de 30 minutes pour les autres supports (figure4). Pendant la durée de l'exposition, les cônes sont maintenus à 25°C sous une lumière tamisée. A la fin du temps de l'exposition, les moustiques sont transférés dans des gobelets pourvus de coton imbibé de miel. Ces gobelets sont rangés sur un portoir l'un après l'autre. Le taux de KD est noté à intervalles réguliers ou après 30 et 60 minutes. Les moustiques sont ensuite placés en obscurité pendant 24 heures entre 26 et 28°C et 80 à 100% d'humidité relative. Après ce délai le nombre d'individus morts est compté. Pour que le test soit validé il faut que la mortalité chez les témoins négatifs (support non imprégné) soit inférieure à 20%. Lorsque celle-ci est comprise entre 5 et 20% la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott.



**Figure 4:** Photographie montrant un cône OMS

Source : Rolande Assogba, 2018

### *Test en tunnel*

Le test en tunnel a pour but d'évaluer l'impact des moustiquaires imprégnées d'insecticides sur des moustiques adultes dans des conditions de laboratoire simulant les conditions du terrain (cases africaines par exemple). Le tunnel est en verre rectangulaire et divisé en deux compartiments séparés au deuxième tiers de sa longueur par des rails en aluminium. Ensuite on prépare un cadre en carton dont les dimensions extérieures correspondent à celle des rails du tunnel qui recevra ce cadre. Le tulle moustiquaire imprégnée d'insecticide est placé en l'agrafant au cadre en carton puis percé de 9 trous. L'ensemble est ensuite placé dans le rail du tunnel puis les bords sont fermés avec du ruban adhésif (figure 4). Le cobaye maintenu en contention est disposé dans une cage grillagée dans le petit compartiment et les tulles moustiquaires non imprégnées sont montés à chaque extrémité du tunnel. A l'aide de l'aspirateur, aspiré dans une cage de 5 à 7 jours, cent femelles de moustiques n'ayant jamais pris du sang dans le grand compartiment. Ce test est lancé à partir de 17h00 et la lecture de la mortalité est faite le lendemain (9heures). Le lendemain matin les femelles sont dénombrées dans les deux compartiments et classées selon qu'elles sont gorgées ou non-gorgées, vivantes ou mortes, d'un côté ou de l'autre de la moustiquaire imprégnée.

Pour que le test soit validé, il faut que la mortalité chez les témoins soit inférieure à 20% et leur taux de gorgement supérieur à 45%



**Figure 5 :** Photographie montrant la préparation du test en tunnel  
Source : Rolande Assogba, 2018

#### **3.4.4. Dissection des ovaires de femelles de moustiques et détermination de la parité**

La dissection des ovaires de moustique femelle (figure 5) permet d'obtenir de nombreux renseignements sur la biologie des moustiques. En disséquant les ovaires et en les examinant, si la femelle est pare (c'est-à-dire qu'elle a déjà pris au moins un repas de sang et a pondu au moins une fois) ou nullipare (c'est-à-dire qu'elle n'a pas encore pris de repas de sang et n'a jamais pondus). Seules les femelles à jeun ou fraîchement gorgés se prêtent à cette de détermination de la parité.

Avant la dissection, les moustiques sont endormis pendant une dizaine de minute à  $-10^{\circ}\text{C}$  ou avec de l'éthanol à  $70^{\circ}\text{C}$ . Ensuite chaque femelle est déposée sur une lame microscopique, l'extrémité de l'abdomen en contact avec une goutte d'eau distillée et face ventrale vers l'observateur. A l'aide d'une loupe, une première aiguille est placée contre le thorax, au niveau du premier sternite de l'abdomen afin de permet maintenir le moustique dans cette position. Une seconde aiguille est appuyée entre le sixième et le septième sternite, en médiane. Cette aiguille, fortement pressée est déplacée par une série de petits coups secs, ce qui permet la section de l'extrémité de l'abdomen à laquelle reste attachés l'ensemble des organes de reproduction. L'estomac et les tubes de Malpighi sont également entraînés. A l'aide des aiguilles les deux ovaires sont alors isolés par section de l'oviducte commun, puis séparés l'un de l'autre. Les ovaires sont retirés de la lame à l'aide d'une aiguille et sont déposés dans une goutte d'eau distillée sur une autre lame pour être séchés. Les impuretés

accompagnant l'ovaire sont nettoyées, puis son réseau trachéolaire est observé au microscope.



**Figure 6:** Photographie montrant la dissection de l'ovaire à la loupe  
Source : Rolande Assogba, 2018

Pour déterminer si la femelle de moustique dont l'ovaire est disséqué est nullipare ou par, on examine les ovaires séchés au microscope à l'objectif 10X et, si nécessaire à l'objectif 40X pour confirmer. Ainsi, les femelles ayant les trachéoles ovariennes enroulées en pelotes sont nullipares et les femelles ayant les trachéoles ovariennes étirées sont par.

### **3.4.5. Extraction de l'ADN des moustiques**

L'extraction d'ADN est une technique qui permet d'isoler l'ADN des cellules et des tissus. L'ADN ainsi extrait peut être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire telles que la PCR et le séquençage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN des moustiques qui suivent approximativement les mêmes étapes qui sont la lyse des cellules, la séparation de l'ADN, la précipitation de l'ADN et la purification.

Au cours de notre stage, c'est le protocole de Livak que nous avons utilisé et ce protocole est décrit comme suit : Après avoir préparé la solution de Livak, elle est mise à 65°C pendant 15min. Aux tubes eppendorf contenant chacun un moustique femelle, on ajoute 50ul de livak et ensuite le moustique est broyé avec un piston, qui est rincé avec 50ul de livak. Le mélange obtenu est immédiatement incubé à 65°C pendant 30min puis centrifugé brièvement. Après centrifugation, 14ul de l'acétate-k-8M est ajouté. Suite à l'homogénéisation, le mélange est incubé sur de la glace pendant 30min avant d'être centrifugé à 13000rpm pendant 20min à

4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube eppendorf de 1,5ml auquel 200ul d'éthanol à 100% est ajouté ensuite le mélange est centrifugé à 13000rpm pendant 15min à 4°C. Après avoir vidé l'éthanol du mélange, de l'éthanol glacé 70% est ajouté et le nouveau mélange est centrifugé à 13000rpm pendant 10min. Enfin l'éthanol est vidé, puis le culot d'ADN est laissé sécher pendant environ 1heure avant d'être suspendu dans 20ul d'eau pour la caractérisation moléculaire.

### **Composition du livak**

1.6ml 5M NaCl

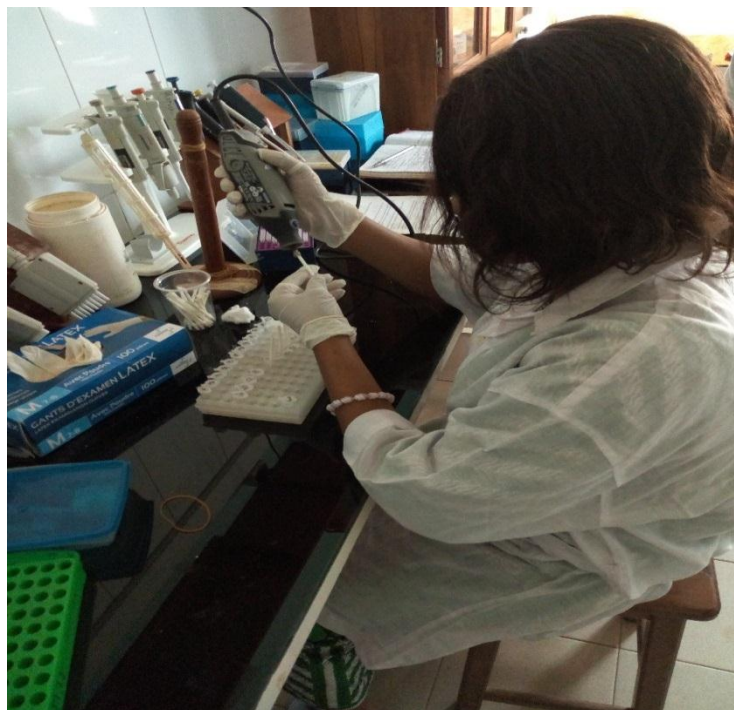
5, 8g sucrose

1,57g tris

10, 16ml 0,5M EDTA

2 ,5ml 20% SDS

Qsp 100ml d'eau .filtrer, stériliser et aliquoter (1,5ml) .Conserver à -20°C



**Figure 7:** Photographie montrant le Broyage de moustiques  
Source : Rolande Assogba, 2018

#### **4. Difficultés rencontrées**

Au cours de notre séjour à l'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sise à Abomey-Calavi, nous avons rencontré des difficultés au nombre desquelles, on peut citer d'une part le dysfonctionnement du radiateur et du climatiseur à l'insectarium dus aux coupures régulières de l'électricité et d'autre part le nombre de tunnel insuffisant, ce qui ne permet pas de tester plusieurs moustiquaires à la fois.

#### **5. Choix d'un sujet de recherche**

##### **5.1. Introduction**

Le paludisme est l'une des maladies les plus répandues dans le monde et plus précisément en Afrique Sub-saharienne (OMS, 2011). Endémie parasitaire majeure, le paludisme ou malaria est due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par moustique femelle du genre *Anopheles*, elle-même infectée après avoir piqué un homme impaludé. En effet, la femelle, en prenant son repas de sang, ingère un hématozoaire du genre *Plasmodium* qui est responsable de la maladie. Il tue un enfant toutes les 30 secondes en Afrique. Deux milliards d'individus, soit 40% de la population mondiale sont exposés à cette maladie et on estime à 500 millions le nombre de cas cliniques survenant chaque année (Danis and Gentilini, 1998 ; Ministère de la Santé, 2005). Le paludisme est la plus importante affection parasitaire dans le monde et constitue un véritable frein au développement socio-économique en Afrique. L'Afrique Sub-saharienne est la zone la plus vulnérable à cette maladie. Près de 81% des cas palustres (soit environ 174 million) y ont été constatés. Au niveau des décès, la presque totalité a été enregistrée en Afrique noire (91%) (OMS, 2011). Précisément au Bénin, le paludisme représente 30% des motifs de consultation dans les formations sanitaires et son incidence a atteint 41,8% en 2004 (Ministère de la Santé, 2004). Il demeure donc, la première cause de morbidité et de mortalité dans les groupes vulnérables, à savoir les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes.

Le 30 Octobre 1998, l'OMS, le PNUD, l'UNICEF et la Banque Mondiale ont lancé le Programme « Faire Reculer le Paludisme » (FRP) qui s'est fixé comme but de lutter contre le paludisme en Afrique. L'objectif de ce programme est de réduire la mortalité liée au paludisme de 50% en 2010, de 30% en 2015 et de 20% en 2025. Ainsi, en l'an 2030, le paludisme devra cesser d'être une cause majeure de morbidité, de mortalité et de pertes socio-économiques (Ministère de la Santé, 2005 ; OMS, 2001). Afin d'atteindre ces différents objectifs, des stratégies de lutte contre le paludisme ont été élaborées. Ces stratégies sont

basées, entre autres, sur des mesures préventives axées sur la chimioprophylaxie, la lutte antivectorielle et les mesures curatives reposant sur la prise en charge rapide et correcte des cas cliniques. Concernant les mesures préventives, l'OMS accorde une place importante à la lutte antivectorielle et particulièrement aux méthodes de protection individuelles et collectives notamment l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (Coosemans and d'Alessandro, 2001). Plusieurs études ont montré une forte résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires (Diabaté *et al.*, 2002 ; N'guessan *et al.*, 2003 ; Tripet *et al.*, 2007; Dabiré *et al.*, 2008, 2009). Cette forte résistance compromet potentiellement l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides diminue (Hemingway and Ranson, 2000). Pour tester au laboratoire l'efficacité des moustiquaires imprégnées, un temps d'exposition de 3 minutes est recommandé par l'OMS. Il est possible que dans les conditions naturelles, les moustiques résistants resteraient plus contact avec les moustiquaires en alors nous sommes posé la question de savoir si une variation du temps d'exposition de moustiques résistants influencerait-elle pas la mortalité des de ces derniers.

### **Objectif général**

Etudier au laboratoire l'évolution du taux de mortalité des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* résistantes, vecteur majeur du paludisme au Bénin en fonction du temps d'exposition aux moustiquaires imprégnées d'insecticides.

### **Objectifs spécifiques**

- Déterminer l'influence du temps d'exposition sur le taux de KD des moustiques sauvages au moustiquaire imprégnée d'insecticide ;
- Déterminer l'influence du temps d'exposition sur le taux de mortalité des moustiques sauvages au moustiquaire imprégnée d'insecticide ;

### **Hypothèses**

- Le taux de KD des moustiques sauvages varie en fonction du temps d'exposition au moustiquaire imprégnée d'insecticide
- Le taux de mortalité des moustiques sauvages varie en fonction du temps d'exposition au moustiquaire imprégnée d'insecticide

## 5.2. Synthèse bibliographique

### 5.2.1 Vecteurs du paludisme

Les vecteurs du paludisme sont des Arthropodes appartenant à la classe des Insectes, l'ordre des Diptères, au sous ordres des Nématocères et à la grande famille des Culicidae. Cette famille comporte plus de 3450 espèces et sous espèces regroupées en trois sous familles : les Toorhynchitinae, les Anophelinae et les Culicidae (Bruce-Chwatt *et al.* 1985). Parmi ces sous familles, celle des anophelinae est constituée de trois genres (*Bironella*, *Chagasia*, *Anopheles*). Le genre *Anopheles* est le plus important sur le plan médical. Il regroupe 400 espèces dont 70 sont morphologiquement identiques et isolées, ce sont les complexes d'espèces (Mouchet et Carnevale, 1991).

*An.gambiae* (figure7) est connu comme un complexe d'espèces et comprend sept espèces jumelles qui sont : *An. gambiae s.s* Gilles, 1902, *An.merus* Doenitz, 1902, *An.melas* Théobald, 1903, *An. arabiensis* Patton, 1905, *An.bawambae* White, 1985, *An.quadriannulatus* Théobald, 1911.



**Figure 8 :** Photographie montrant l'*Anopheles gambiae*

Source : [:\(en.wikipedia.org/wiki/file :anophelesgambiaemosquito.jpg\)](http://en.wikipedia.org/wiki/file:anophelesgambiaemosquito.jpg) Avril 2011

## 5 .2.2 Résistance des vecteurs aux insecticides

### 5.2.2.1 Définition de résistance

La résistance peut être définie comme étant la capacité pour un organisme donné de survivre à des doses de produit toxique qui auraient dû normalement le tuer. Il s'agit d'un caractère héréditaire donc, sous la dépendance de gène (Guillet *et al.*, 1995).

### 5.2.2.2 Différents mécanismes de résistance

Le mécanisme de résistance peut être basé soit sur des mutations du site cible ou soit sur un changement qualitatif et/ou quantitatif des enzymes de détoxification de l'insecte. Il existe également une résistance due à un changement dans le comportement de l'insecticide qui

évite tout contact avec l'insecticide. Mais cette résistance comportementale est moins fréquente que les deux autres types de résistance cités précédemment. Ainsi, nous distinguons trois types de mécanismes de résistance qui se traduisent par des modifications comportementales, physiologiques et biochimiques.

La résistance comportementale s'observe au niveau de l'insecte qui présente un comportement différent, empêchant le toxique d'agir ;

La résistance physiologique s'exprime au niveau des tissus et organes ; elle est caractérisée par une diminution de la pénétration ou par une augmentation de l'excrétion des insecticides ;

La résistance biochimique se situe au niveau cellulaire ; elle consiste d'une part, en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de détoxification et d'autre, en une diminution de l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides.

La modification du site d'action concerne essentiellement trois cibles : les canaux sodium (pyréthrinoïde et organochlorés), le cholinestérase (les organophosphorés et carbamates), les récepteurs (GABA) de l'acide gamma-amino-buturique, les cyclodiènes (Eric et Marcel, 1998). Quant aux enzymes, il s'agit d'une augmentation soit du nombre, soit de l'activité des transférases, principalement le glutathion-s-transférase (pyréthrinoïdes, organochlorés et carbamates), des oxydes (pyréthrinoïdes organophosphorés et carbamates) ou des estérases (et pyréthrinoïdes, organophosphorés) (Eric et Marcel, 1998). Le mécanisme de résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes est dû principalement à une mutation au niveau des canaux sodiques voltage dépendant en provenance des membres nerveux (Chandre, 2000). Cette mutation correspond à la substitution leucine-phénylamine (chez les moustiques de l'Afrique Orientale). Ce mécanisme est également responsable de l'allongement du temps de Knock down ou temps nécessaire pour que l'effet de l'insecticide assomme le moustique. Il est par ailleurs, l'un de ceux, responsables de la résistance croisée de *anopheles* au DDT et aux Pyréthrinoïdes et se caractérise par une diminution de l'affinité entre les canaux sodiques et insecticides. En effet chez de nombreux insectes, un seul mécanisme de résistance peut conférer une résistance envers plus d'un insecticide. Il s'agit de la résistance croisée. Le DDT et les pyréthrinoïdes ont le même mode d'action sur les canaux sodium des membranes nerveuses. De ce fait, un moustique qui développe une résistance aux pyréthrinoïdes par mutation au niveau des canaux sodium, sera par conséquent résistant au DDT et vice versa (Chandre, 1999).

### **5.2.3. Moustiquaire imprégnée**

Une moustiquaire est définie comme un rideau de gaze ou de mousseline dont on entoure les lits ou qu'on place aux fenêtres pour se protéger des moustiques. La moustiquaire est passée en moins d'un quart de siècle du simple statut d'objet de confort à celui de composante clef des stratégies de lutte antipaludique et elle reste la cible majeure pour la lutte contre le paludisme. La moustiquaire imprégnée d'insecticide s'est affirmée en quelques années comme un outil privilégié de lutte contre le paludisme. En effet, une moustiquaire, par elle-même, protège contre les agressions physiques et sonores (piqûres de moustiques et autres arthropodes hématophages, morsures d'araignées et de serpents, gênes ou bruits occasionnés par les mouches, cafards, etc.). Elle ne protège toutefois pas complètement des moustiques pour peu qu'elle ait le moindre trou, qu'elle soit déchirée, mal bordée ou tout simplement qu'une partie du corps du dormeur entre en contact avec le tulle pendant le sommeil.

L'imprégnation d'insecticide pallie ces inconvénients. Les produits retenus sont tous des pyréthrinoïdes, famille de composés à la fois peu toxiques pour l'homme, efficaces à faible dose, qui ont une action rapide (effet choc), un effet irritant pour l'insecte et plus ou moins répulsif. Placées à l'intérieur des maisons, les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes peuvent réduire le nombre de moustiques qui pénètrent dans les chambres (effet dissuasif), éviter qu'ils ne piquent à travers la moustiquaire ou ne passent au travers des trous (effet irritant), les inciter à sortir de la maison (sous l'action combinée d'un effet répulsif et irritant), les assommer dès qu'ils sont en contact avec le tulle et, bien entendu, les tuer. L'utilisation de la moustiquaire présente parfois des avantages inattendus, en étant par exemple considérée comme la manifestation d'une promotion sociale, ou encore comme un lieu d'intimité où l'on aime se réfugier dans les cases familiales. Mais des inconvénients existent aussi. Certaines personnes sont en effet allergiques aux insecticides employés, claustrophobes ou intolérantes à la chaleur. Parfois, l'utilisation des moustiquaires va à l'encontre de certaines traditions, croyances ou pratiques sociales. Ainsi, la plupart des moustiquaires sont blanches, ce qui a posé des problèmes d'acceptabilité dans quelques sociétés où le linceul, par tradition, est de couleur blanche (Hougard, 1999).

## **6. Méthodologie**

### **6.1. Cadre d'étude**

Cette étude sera réalisée au laboratoire de l'annexe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

### **6.2. Méthode d'étude**

Pour ce travail de recherche nous effectuerons une prospection larvaire dans plusieurs communes du Bénin en vue de collecter des larves de moustiques sauvages. Les larves collectées seront ramenées à l'insectarium pour être élevées. Des tests de bio efficacité (test en cône) seront réalisés sur des moustiques adultes issus des bacs de larves ramenés du terrain. Les moustiques âgés de 3 à 5 jours seront utilisés à cet effet.

### **6.3. Exposition des anophèles à la moustiquaire imprégnée d'insecticide**

La moustiquaire expérimentale qui sera utilisée devra être une moustiquaire imprégnée d'insecticide qui n'a jamais été lavée ni exposée au soleil avant l'expérience (moustiquaire neuve). Les cônes standardisés par l'OMS seront utilisés. Ce dispositif permettra ainsi de s'assurer que les tarse du moustique soient bien en contact avec le support traité tout au long de l'exposition. Lors du déroulement du test, un total de 20 moustiques femelles sera exposé sur chaque côté de la moustiquaire. Les temps d'exposition des moustiques (à jeun et âgés de 3 à 5 jours) qui seront retenus pour cette expérience seront de 3 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 1 heure30minutes et 2 heures. Pendant toute la durée de l'exposition, les cônes seront maintenus à 25°C.

Après exposition les moustiques seront retirés des cônes puis transférés dans des gobelets et les taux de KD seront notés après 30min et 1h. Les moustiques seront ensuite nourris au jus sucré et placés en observation pendant 24h à une température entre 26 et 28°C et 80% à 100% d'humidité. Les taux de mortalités seront calculés après 24h.

## **7. Résultats attendus**

- La variation des taux de KD en fonction du temps d'exposition sera déterminée
- La variation des taux de mortalité en fonction du temps d'exposition sera déterminée

## **8. Conclusion**

La réussite pour faire reculer le paludisme doit nécessairement passer par la prévention, le suivi et l'évaluation de l'utilisation des moustiquaires imprégnées. La moustiquaire imprégnée d'insecticide est efficace dans le cadre de la lutte anti vectorielle contre le paludisme. Pour évaluer cette efficacité il est souhaitable que des études soient faites en tenant compte des temps d'exposition proposés dans ce travail.

## 9. References

- Bruce-Chwatt LJ. (1985).** Essential Malariology. (Second edition), London, William Heinmann Medical books Ltd, p 452.
- Chandre F, Diarrier F, Manga L, Akogbéto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. (1999).** Status of parathyroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. Bulletin of the World Health Organization, 77: 230-234.
- Coosemans M, d'Alessandro U. (2001).** Plaidoyer pour les moustiquaires imprégnées dans les programmes de lutte contre le paludisme. Bulletin de la société de Pathologie Exotique ,94 ,2 bis, p.169-173
- Dabiré KR, Diabaté A, Djogbéno L, Baldet T, Ouari A, N'Guessan R, Ouédraogo IB, Costantini C, Hougard JM, Chandre F. (2008).** Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. Malaria Journal, 7:188 doi: 10.1186/1475-2875-7-188
- Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, Djogbenou L, Kengne P, Brengues C, Gouagna LC, Hougard 1M, Chandre F, Baldet T. (2009).** Distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1<sup>R</sup>) in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa). Tropical Medicine and International Health, 14(4):396-403. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02243.x
- Danis M, Gentilini M. (1998).** Le paludisme fléau mondial Revue Pratique, 48, p .254-257
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Guiguendé TR, Guillet P. (2002).** First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* from Burkina Faso, West Africa, Parasitologia, 44(3-4).157-158
- Fontenille D. (2003).** *Anopheles gambiae* : Séquence et conséquences, un plus pour le paludisme, les dossiers sciences au sud-le journal de l'IRD, avril 2003
- Guillet P, Sékétéli A, Alley ES, Agoua H, Boatin B., Bissan Y, Akpoboua LKB, Quillévéré D, Samba EM. (1995).** Impact of combined large-scale ivermectin distribution and vector control on transmission of *Onchocerca volvulus* in the Niger basin, Guinea. Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, 73 (2), 199-205. ISSN 0043-9686
- Hemingway J, Ranson H. (2000).** Insecticides resistance in insect vectors of human disease. Annual Review entomology 45, 371-391

- Hougard J-m. (1999).** La lutte contre l'onchocercose : un succès ? In : Sixièmes actualités du Pharo : les grandes endémies en Afrique et communications libres en pathologie tropicale. Médecine Tropicale, 59 (2 suppl.), 15-19.
- Ministère de la santé (2004).** Annuaire des statistiques sanitaire. Bénin, p .82-85.
- Ministère de la santé (2005).** Programme national intégré de lutte contre le paludisme (Un avenir sans paludisme). Plan stratégique FRP au Rwanda 2005-2010
- N'guessan R, Darriet F, Guillet P, Camevale P, Traoré Lamizana M, Corbel V, koffia A, Chandre F. (2003).** Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Medical and Veterinary Entomology, 17:1-7.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (2001).** Collecte des données de bases sur la morbidité et la mortalité dues au paludisme dans le cadre de suivi. Evaluation RBM au Bénin .Rapport d'enquête, Bénin ,12 pages
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (2009).** World Malaria report
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (2011).** World Malaria report
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (2013).** Test procedures for insecticide résistance monitoring in malaria vector mosquitoes, 18:40p
- Tripet F, Jennifer W, Anthon C. (2007).** Longitudinal survey of Knockdown Resistance to Pyrethroid (KDR) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* S.S. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 76(1), pp. 81-87.