



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 (LEBA)

*Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à
une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans
l'Alibori*

Présenté par :

Stève Zinsou HOUGBE

Sous la supervision du :

Professeur Martin C. AKOGBETO

Directeur du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou.

2^{ème} Promotion

Année académique : 2016-2017

C.R.E - COTONOU

Remerciements

Il y a des choses dans la vie qui ne peuvent s'imaginer, encore moins se réaliser sans l'aval ni le précieux concours d'autrui. Méconnaître à ce dernier le mérite inhérent à sa sollicitude serait tout simplement de l'ingratitude. C'est pour cela que nous tenons à adresser nos remerciements et à exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui ont apporté leur aimable concours à l'élaboration de ce mémoire de licence, en l'occurrence :

- **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. Professeur, trouvez dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect ;
- **Professeur Michel SEZONLIN**, Coordonnateur adjoint 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). Vous avez été l'un des dirigeants de cette formation. Vos illustres conseils durant l'année universitaire, votre disponibilité à nous écouter ainsi que votre rigueur dans la ponctualité a été pour nous une grande source de motivation. Sincères mercis ;
- 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 des travaux pratiques bien réalisés qui nous font rêver d'être Enseignant Chercheur. Recevez à travers ce document, nos sincères remerciements.

Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori

- Les enseignants chercheurs du CREC, **Dr OSSE Razack**, **Dr AÏKPON Rock** et **Dr BIO Bangana Abdoul Sahabi** que nous remercions très sincèrement pour leur contribution à la réalisation du présent rapport.
- 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 appui technique qui ont rendu possible ce rapport ;
- Messieurs **Aboubakar SIDICK**, **Idelphonse AHOGNI**, **Hermann SAGBOHAN**, **Casimir KPANOU**, **Ludovic N'TCHA**, **Boulais YOVOGAN**, **André SOMINAHOUN** et **Wilfrid SEWADE**, pour leurs assistance et leurs vie de fraternité partagée avec nous ;
- Monsieur **Juvénal AHOUANDJINO**, pour toute sa contribution et ses conseils.
- Mr **Lazare HOUNKANRIN** et Mr **Issiaka ADELODJOU** pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation des travaux à l'insectarium du CREC ;
- Mon papa **HOUGBE D. Avocé** et ma maman **KIKI Suzanne**, pour tous leurs soutiens et conseils de savoir –être, savoir-vivre et savoir-faire. Ceci est un fruit de vos souffrances et sentiments positifs à l'endroit de notre personne et la joie certaine de vivre que vous nous procurez ;
- Mes frères et sœurs surtout à ma sœur jumelle **Estève Zinhoue HOUGBE**, je n'exprimerai jamais tout l'amour que je ressens pour vous. Je vous souhaite beaucoup de courage et de chance dans la vie que nous menons ensemble ;
- Monsieur **Noé Nicaise BOKO**, sa femme **Flore Augusta ADECHIAN** ainsi que leurs enfants pour leurs assistances fraternelle et leurs précieux conseils qui m'ont beaucoup réconforté durant les moments difficiles. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude ;
- 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;

Nous ne saurons finir sans manifester notre reconnaissance à tous nos proches qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail (famille, amis, aînés de filière, stagiaires du CREC...). A toutes et à tous, nous disons un sincère merci.

Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori

Résumé

Parmi les maladies ou parasitaires qui occasionnent le tiers des décès annuels dans le monde, 18% sont transmises par des arthropodes. 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 Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). Cela nous a permis d'appliquer les enseignements théoriques reçus au cours de notre formation et de proposer une étude sur la « Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à la mise en œuvre de la pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori ». Pour atteindre cet objectif, l'échantillonnage des populations d'*Anophèles* sera réalisé sur une base mensuelle de mai 2019 à novembre 2019 par capture sur appât humain à l'intérieur et à l'extérieur des habitations afin d'évaluer le taux et le comportement de piqûre des vecteurs et par aspersion de bombe aérosol. Après identification taxonomique des anophèles récoltés, les têtes et thorax de *Anopheles gambiae s.l* seront analysés par dosage Immunoenzymatique (Elisa CSP) afin de déterminer l'indice sporozoïtique (IS). Le taux d'inoculation entomologique sera également calculé par la formule $TIE = Ma \times Is$. L'une des recherches en entomologie médicale menées par le CREC a pour objectif de disposer d'informations sur la variation spatio-temporelle et le pic de la transmission du paludisme dans ce département cible en prélude à cette stratégie de lutte antivectorielle. Ces données de base seront consultées pour une meilleure planification des opérations de pulvérisation. Elles seront également utilisées comme témoin afin de mesurer l'impact de l'intervention après sa mise en œuvre.

Mots clés : CREC, Entomologie, Paludisme, *Anopheles gambiae*, PID.

Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori

Abstract

Among the infectious or parasitic diseases, that cause the third annual death in the world, 18% are transmitted by arthropods. The population of most African countries including Benin are affected by vectorial transmission diseases. One of the major challenges facing these countries is vector control. This is what justified our internship which took place at the center of Entomological Research of Cotonou (CREC). This allowed us to apply the theoretical lessons we receive during our training and to propose a study on «Dynamic of the transmission of Malaria to an indoor residual spraying campaign in Alibori» To achieve this goal, the sample of *Anopheles* population will be realized on a monthly basis from May 2019 to November 2019 by the capture on human bait inside and outside residences in order to estimate the rate and the behavior of the vectors and by spraying aerosol bomb. After the taxonomic identification of the anopheles accumulated, the heads and the thorax of the *Anopheles gambiae s.l.* will be analysed by immuno-enzymatic dosage (Elisa CSP) in order to determine the zoospore clue. The entomologic inoculation rate will also be calculated by using the following formula: $TIE = Ma \times Is$. One of the research in medical entomology conducted by the CREC goal was to have information about the spatio-temporal fluctuation and the picture of malaria's transmission in the targeted department in prelude to this strategy of anti vectorial battle. These basic data would be consulted for a better planning of the spraying operations. They would also be used as witnesses in order to measure the impact of the intervention after its implementation.

Keys words: CREC, Entomology, Malaria, *Anopheles gambiae*, IRS

Liste des sigles et abréviations

- CREC** : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou
- CSP** : Circumsporozoïtic Protein
- ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- IS** : Indice Sporozoïtique
- PHN** : Piqûre par Homme et par nuit
- LAV** : Lutte Antivectorielle
- LEBA** : Licence Evolution Biodiversité des Arthropodes et Assainissement
- LLIP** : Laboratoire de Lutte Intégrée contre le Paludisme
- LSHTM** : London School of Hygien and Tropical Medecine
- MILD** : Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- PID** : Pulvérisation Intra Domiciliaire
- PNLP** : Programme National de Lutte contre le Paludisme
- TIE** : Taux d'Inoculation Entomologique
- WHO** : World Health Organization

Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des sigles et abréviations	v
Table des matières	vi
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	viii
1- Introduction générale	1
2- Objectifs du stage.....	3
2-1- Objectif général	3
2-2- Objectifs spécifiques.....	3
3- Description du Centre de Recherches Entomologique de Cotonou.....	4
3-1- Cadre physique	4
3-2- Personnel.....	7
3-3- Les thématiques de recherche au CREC.....	9
3-4- Activités menées.....	10
3-4-1- Activités menées à l'insectarium.....	10
3-4-2- Activités menées sur le terrain	11
3-4-3- Activités menées au laboratoire	13
3-5- Difficultés rencontrées au cours de notre stage	14
4- Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori.....	14
4-1- Introduction.....	14
4-2- Synthèse bibliographique.....	16

*Dynamique de la de transmission du paludisme en prélude à une campagne de
pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori*

4-3- Méthodologie.....	21
4-3-1- Zone d'étude.....	21
4-3-2- Matériels et Méthodes	21
4-4- Résultats attendus	23
5- Conclusions.....	24
6-References bibliographiques.....	25
Annexe	30

Liste des figures

Figure 1 : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou 4

Figure 2: Bacs de larves de moustiques en cours d'élevage au lavarium du CREC 6

Figure 3 : cages des moustiques de la souche Kisumu en cours d'élevage à l'insectarium 6

Figure 4 : Animalerie du CREC 7

Figure 5: Capture de nuit sur appât humain. 12

Figure 6 : Capture par spray matinal 12

Figure 7 : Plaque Elisa montrant les moustiques positifs à l'antigène circumsporozoitique..... 14

Figure 8 : Cycle de développement du *P. falciparum* (Ghosh et al., 2000) 18

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des travaux à l'insectarium par semaine11

1- Introduction générale

L'embranchement des arthropodes comprend, à l'heure actuelle, plus d'un million d'espèces animales, soit près de 90 % des espèces animales vivant sur terre. Ils sont à l'origine de 18% des maladies infectieuses ou parasitaires les plus mortelles dans le monde, obligatoirement transmises par un intermédiaire vivant (le vecteur), le plus souvent un insecte hématophage à l'occasion d'un « repas de sang » (WHO, 1998). 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 maladie de CHAGAS (triatomes), 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 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. Dans le cadre des recherches de solutions, 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 ce règne animal (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 est l'un des facteurs de prolifération de ces organismes nuisibles. Plusieurs instituts et centre de recherches participent conjointement à ces formations et à la surveillance de ces vecteurs de maladies. Le Centre de Recherche Entomologique 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.

Dans l'optique de renforcer nos connaissances acquises au cours de notre formation et de pouvoir se familiariser au monde professionnel, nous avons eu à effectuer un stage de trois mois (Décembre 2017 à Mars 2018) dans ce Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou. Au cours de ce stage, nous avons eu à effectuer plusieurs activités. Dans les lignes à suivre, nous présenterons les objectifs de notre séjour au CREC, la description du centre, les différentes activités menées, les difficultés rencontrées et la présentation d'un projet de recherches portant sur un domaine de recherche au CREC : "**Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intra domiciliaire dans l'Alibori**".

2- Objectifs du stage

2-1- Objectif général

L'objectif général visé est d'appliquer les connaissances théoriques acquises au cours de notre formation aux activités pratiques menées au Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou.

2-2- Objectifs spécifiques

- Comprendre les techniques d'échantillonnage et d'élevage des moustiques et les pratiques de laboratoire de recherche.
- Proposer un projet de recherche sur la dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori

3- Description du Centre de Recherches Entomologique de Cotonou

Le Centre de Recherche Entomologique 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 abrité la Centrale d'Achats des Médicaments Essentiels (CAME), à l'Est par la Société Béninoise des Peintures et Colorants (SOBEPEC), à l'Ouest par le Service d'Hygiène des Eaux et Aliments (SHEA) (Figure 1).

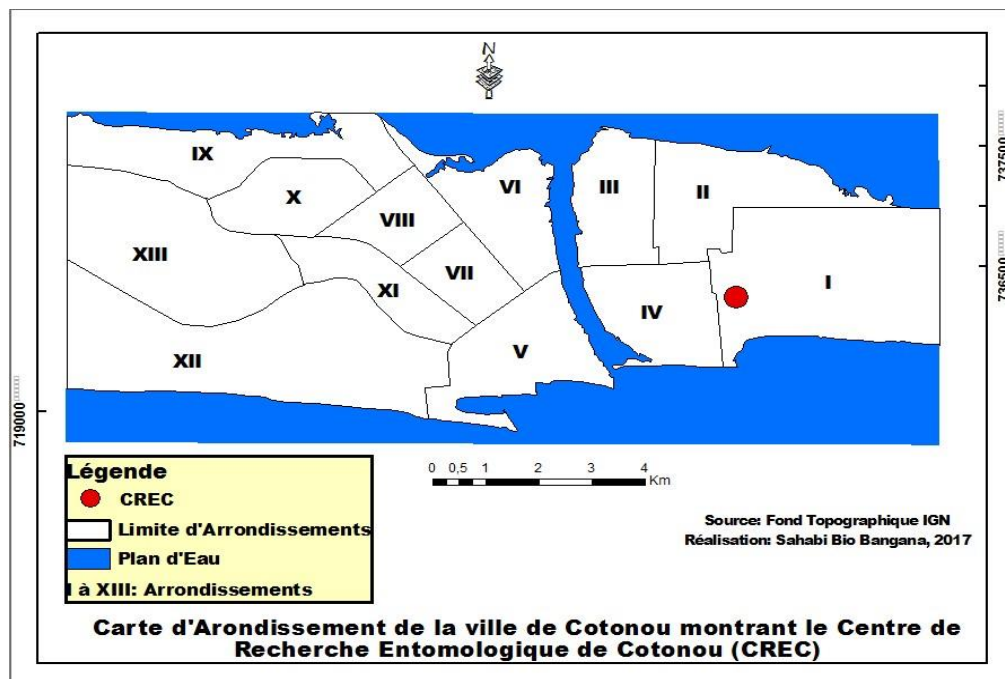


Figure 1 : Carte de la Ville de Cotonou indiquant la localisation du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

3-1- Cadre physique

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

➤ **Laboratoire d'entomologie appliquée**

Dans ce laboratoire, les moustiques échantillonnés sont identifiés et séparés morphologiquement avec la clé de détermination de Gillie et Melon (1998). 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, les loupes, lampes, des pinces, de microscopes pour la lecture de la parturité des moustiques.

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

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

➤ **Laboratoire de contrôle de qualité des outils de lutte antivectorielle**

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 MILD sur le comportement des moustiques adultes dans des conditions de laboratoire proches de celles du terrain.

➤ **Laboratoire de parasitologie**

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

➤ **Laboratoire des tests insecticide**

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.

➤ **Insectarium**

L'insectarium est composé de deux blocs. Le premier bloc appelé lavarium (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 muni des 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 accueille 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 BoboDioulasso au Burkina-Faso.



Figure 2: Bacs de larves de moustiques en cours d'élevage au lavarium du CREC (Steve Z. HOUGBE, CREC 2018).

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 de la souche sensible 'Kisumu et VK-Per'.

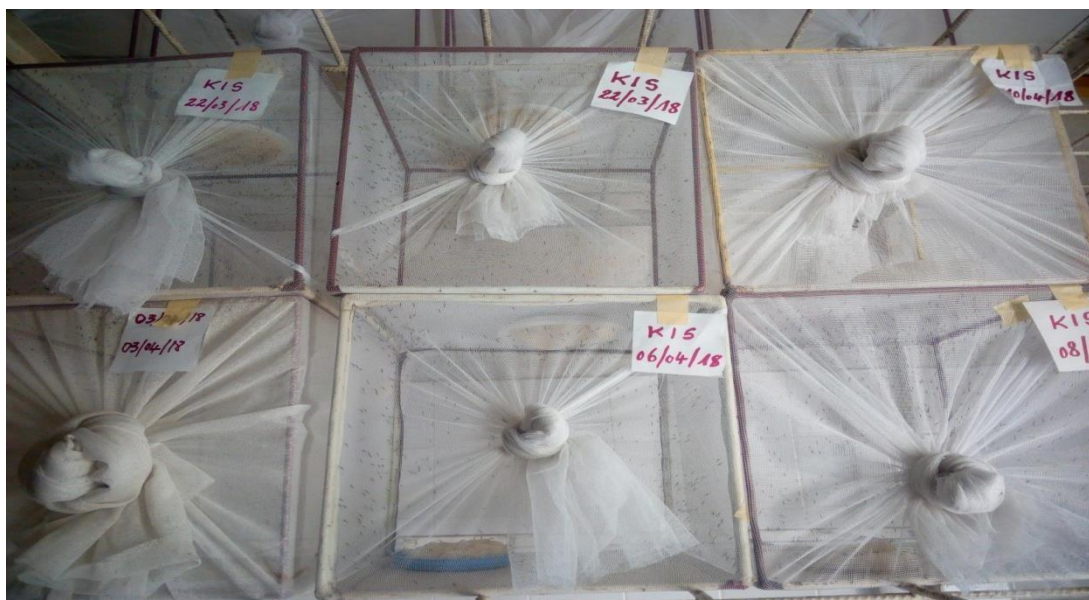


Figure 3 : cages des moustiques de la souche Kisumu en cours d'élevage à l'insectarium (Steve Z. HOUGBE, CREC 2018)

➤ **Animalerie**

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



Figure 4 : Animalerie du CREC (Steve Z. HOUGBE, CREC 2018)

3-2- Personnel

Le Centre de Recherche Entomologique 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** : c'est le 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 ;
- **Les Secrétaires du CREC** : ce sont Madame DURAND Clémence et KINDJI Balbine. Elles sont chargées de la gestion des courriers administratifs et des opérations de saisie informatique ;

- **Chef service administratif et financier** : c'est 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 ;
- **Responsable du laboratoire de biologie moléculaire** : Docteur OSSE Razacki, 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 destination du CREC. Il veille également aux respects des règles d'hygiènes au niveau du laboratoire ;
- **Responsable du laboratoire de Contrôle de Qualité** : Monsieur Idelphonse AHOGNI. Ce laboratoire assure l'appréciation de l'amélioration de l'efficacité, la rentabilité, la pertinence écologique et la durabilité des méthodes de luttés.
- **Responsable du laboratoire d'Entomologie Appliquée** : Dr Germain Gil PADONOU, Enseignant chercheur à 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 forensique sont identifiés et disséqués après leurs captures sur le terrain ;
- **Responsable de l'unité de parasitologie** : Dr NAHUM Alain, 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. Il est chargé de 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 Ichiaka ADELLODJOU ;
- **Les chercheurs du centre sont :**
 - Pr Martin AKOGBETO, prof titulaire, Membre de l'Académie des Sciences du Bénin ;
 - Dr PADONOU Germain Gil, Enseignant Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC);
 - Dr OSSE A. Razacki, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo ;
 - Dr AIKPON Rock, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques d'Abomey ;
 - Dr BIO BANGANA Abdoul Sahabi, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo ;

- Doctorants Albert SALAKO, Idelphonse AHOGNI, Come KOUKPO, Ludovic N'TCHA, Hermann SAGBOHAN, Casimir KPANOU, Arsène FASSINO 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 antivectorielles sous la supervision du Professeur Martin AKOGBETO.

3-3- Les thématiques de recherche au CREC

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

- Biologie et caractérisation des vecteurs du paludisme ; étude de la résistance des vecteurs aux insecticides ; évaluation de l'efficacité des insecticides et des moustiquaires imprégnées.
- Inventaire et biologie des Arthropodes d'intérêt forensique à Cotonou.
- Variabilité de la transmission du paludisme, de la durabilité et l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides en fonction des faciès éco-géographique en zone de savane et de forêt dégradé au Bénin, Afrique de l'Ouest.
- Utilisation des carbamates et des organophosphorés en pulvérisation intra domiciliaire 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 facies géographiques en zone de savane au Benin, Afrique de l'ouest.
- Evaluation 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
- Etude 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 antivectorielle.
- 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 et structure génétiques et la 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
- Evaluation en Phase II de l'efficacité de Clothianidine50 WG, un nouveau produit insecticide à utiliser en pulvérisation intradomiciliaire au Bénin.
- Evaluation 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 Pyréthrinoïdes et une population sauvage résistante dans le traitement de la surface intérieure des murs des habitations dans la commune de Dangbo, Bénin.
- L'efficacité des Moustiquaires Imprégnées d'insecticides à Longue Durée (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 protéine et en sels minéraux. Chaque bac est recouvert de toile moustiquaire et entreposé dans une salle dont l'humidité relative varie entre 70 et 80% et la température entre 25 et 30°C. La photopériode est assurée par des lampes fluorescentes éclairant de 6h : 00 min du matin à 6h : 00 min du lendemain. A l'apparition des nymphes, elles sont prélevées et mises dans une cage cubique de 30 cm de côté pour l'émergence des adultes. Les adultes issus de l'émergence des larves collectées sur le terrain et mis en cage sont nourris au jus de miel (10%). Les femelles adultes de 2 à 5 jours sont isolées pour être soumises aux tests de sensibilité/résistance aux différents insecticides.

Les activités journalières menées à l'insectarium sont regroupées dans le tableau 1 ci-dessous :

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

Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi
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
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	
		Mise en eau des pontes		Mise en eau des pontes
	Diviser les larves L1			Diviser les larves L1

3-4-2- Activités menées sur le terrain

3-4-2-1- Capture directe de moustiques sur homme

Pour évaluer le niveau de la transmission du paludisme dans le département de l'Alibori, nous avons effectué avec l'équipe du CREC les collectes de moustiques sur homme en Janvier 2017 dans les communes de Kandi et Gogounou. Dans chacune des communes d'évaluation, une zone centrale et une zone périphérique ont été choisies et dans chaque commune, deux cases ont été choisies par zone pour la collecte des moustiques. Des captures nocturnes de moustiques agressifs ont été réalisées dans les deux zones à l'aide des tubes à hémolyse de 21h à 05h du matin, sur des sujets humains volontaires (captureurs) qui, au préalable, ont donné leur consentement favorable pour le déroulement de l'activité. Deux volontaires par habitation, soit huit captureurs par commune ont capturé les moustiques. Les captureurs jouant le rôle d'appât humain, sont munis de torche et capturent les moustiques qui se posent sur leurs jambes dénudées avant que ceux-ci ne les piquent (Figure 5). Les captureurs ont effectué une rotation dans les différentes habitations pour éviter les biais liés à leur habileté ou à leur attractivité individuelle. Les spécimens collectés sont référencés et regroupés en fonction de certaines informations que sont la localité, la date, l'heure de capture, la maison et le lieu de capture (à l'intérieur ou à l'extérieur des maisons). Deux nuits de collecte des moustiques ont été effectuées en Janvier 2018.



Figure 5: Capture de nuit sur appât humain.

3-4-2-2- Capture par aspersion d'insecticide à l'intérieur des maisons

Cette méthode permet la collecte des spécimens de moustiques qui sont au repos dans les habitations dénommés encore faune résiduelle. En janvier 2017, 40 habitations ont été pulvérisées dans les communes de Kandi et Gogounou. La méthode consiste à étaler des draps blancs dans les chambres qui sont après fermées et à pulvériser de l'insecticide à base de pyréthrinocide non rémanent dans la pièce en insistant au niveau des issues et des points de cachette (toit, portes, fenêtres, dessous des couchettes) pour « dénicher » les moustiques et éviter au maximum leur sortie. Au bout d'un quart d'heure, les moustiques en général tombent, morts ou assommés, sur le drap et sont ensuite collectés (Figure 6). Cette technique permet de collecter surtout les femelles à différents niveaux de réplétion (gorgées, semi-gravides et gravides).



Figure 6 : Capture par spray matinal

3-4-3- Activités menées au laboratoire

3-4-3-1- Identification, dissection des ovaires et traitement des moustiques

Après la capture, les moustiques collectés sont comptés et séparés en *Culicinae* et *Anophelinae* à l'aide de la loupe binoculaire. Les anophèles sont mis dans des gobelets pour identification selon la clé de Gillies et de Meillon (1968) et de Gillies & Coetzee (1987). Les ovaires des femelles de *An. gambiae s.l* capturés sur appât humain sont disséqués pour évaluer l'âge physiologique de la femelle en observant le degré d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). La dissection de l'abdomen et l'observation au microscope de la morphologie des ovaires a permis de déterminer si :

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

Ceci permet d'estimer les taux de parturité de la population de *Anopheles gambiae s.l*, c'est à- dire la proportion de femelles pares. Ce paramètre reflète l'âge de la population des moustiques. Les populations de *Anopheles gambiae s.l* plus âgées présentent des taux de parité plus élevés. Les populations plus âgées sont davantage susceptibles de transmettre le paludisme parce qu'elles ont vécu suffisamment longtemps pour permettre au parasite de se développer. Les spécimens de *Anopheles gambiae s.l* sont conservés séparément selon le lieu de capture dans des tubes eppendorf étiquetés contenant du silicagel à -20°C avant leur analyse. Tout moustique destiné au test d'ELISA–CSP et à la PCR est divisé en deux parties: la tête thorax pour la première analyse et le reste du corps pour la seconde.

3-4-3-2- Réalisation du test ELISA-CSP pour déterminer le taux d'infectivité

La présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique indique qu'il est capable de transmettre les parasites du paludisme à l'homme. Ceci a été déterminé par le test ELISA (Figure 7).

Cette méthode permet de détecter la protéine circumsporozoïtique (CS) qui recouvre la surface externe du sporozoïte du paludisme et constitue donc un indicateur de l'état infectieux du parasite du paludisme. La protéine CS commence à être exprimée quand le sporozoïte est encore dans l'oocyste mature, dans l'intestin du moustique. On n'analyse donc que les têtes et les thorax des moustiques femelles pour s'assurer que, si la protéine CS est détectée, elle provient très probablement de sporozoïtes qui ont atteint les glandes salivaires et la femelle est donc prête à transmettre les parasites du paludisme. Pour la recherche de cette protéine CS de *Plasmodium falciparum* nous avons utilisé la méthode ELISA décrite par Wirtz *et al.* (1987) (voir protocole en annexe).



Figure 7 : Plaque Elisa montrant les moustiques positifs à l'antigène circumsporozoitique

3-5- Difficultés rencontrées au cours de notre stage

Certaines difficultés ont été rencontrées au cours de notre stage. Parmi les difficultés rencontrées, figurent :

- La piqure des moustiques lors des activités à l'insectarium ;
- Insuffisance de matériel technique au laboratoire ;
- Insuffisance de salle pour les chercheurs, doctorants et stagiaires ;
- Difficultés de travail dû aux coupures intempestives de l'énergie électrique

4- Dynamique de la transmission du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori

4-1- Introduction

La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide à effet rémanent (PID) et les moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) sont deux stratégies clés et efficaces dans la prévention du paludisme (WHO, 2006 ; WHO, 2007 ; RBM, 2012). Par le passé, l'utilisation du DDT en pulvérisation a permis l'élimination ou la réduction considérable du paludisme en Asie, en Russie, en Europe et en Amérique latine où il était considéré comme un problème de santé publique (Schiff, 2002 ; Lengeler, 2003 ; Roberts *et al.*, 2004). Ces dernières décennies, l'utilisation massive de ces outils de lutte a entraîné une réduction spectaculaire des cas de paludisme (WHO, 2015). En Afrique subsaharienne, sur les 663 millions de cas de paludisme évités grâce aux diverses interventions de contrôle mises en œuvre entre 2001 et 2015, 10 % l'ont été grâce aux pulvérisations intra domiciliaires d'insecticides à effet rémanent (WHO, 2015) en dépit de sa faible

couverture des territoires nationaux. Au Bénin, après six ans d'intervention, la PID s'est révélée être un outil de contrôle vectoriel efficace (Akogbéto *et al.*, 2015). Cette intervention démarrée en 2008 dans le département de l'Ouémé (Sud du Bénin) et transférée par la suite dans le département de l'Atacora (Nord Bénin) de 2011 à 2015, a été un grand succès (Akogbéto *et al.*, 2011 ; Padonou *et al.*, 2012 ; Akogbéto *et al.*, 2015). Malgré ces succès, de grands défis restent à relever afin d'optimiser l'efficacité des outils de lutte antivectorielle qui se heurte ces dernières années à un handicap majeur, la résistance des vecteurs aux insecticides. En effet, l'émergence et l'expansion de la résistance des anophèles vecteurs aux insecticides, en particulier aux pyréthrinoides (Chandre *et al.*, 1999 ; Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouleton *et al.*, 2009 ; Djogbéno *et al.*, 2010 ; Djègbè *et al.*, 2011 ; Sovi *et al.*, 2014) et plus récemment au bendiocarb (Aïzoun *et al.*, 2013 ; Aïkpon *et al.*, 2013 ; Gnanguenon *et al.*, 2015) constituent une menace sérieuse à l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle au Bénin (N'guessan *et al.*, 2007). Dans le même temps, le manque au préalable des données de base suffisantes et fiables pour guider l'élaboration des politiques de lutte est une faiblesse dans la mise en œuvre des stratégies de lutte (Marsh, 2010). En effet, la densité et la répartition des anophèles vecteurs du paludisme varient en fonction de la région et de la période de l'année et, ces variations peuvent modifier le niveau de transmission du paludisme (Cox *et al.*, 1999 ; Kleinschmidt *et al.*, 2002 ; Munga *et al.*, 2009 ; Govoetchan *et al.*, 2014). De plus, plusieurs études ont montré que l'infection palustre est influencée par des facteurs environnementaux tels que la température, les précipitations et l'humidité relative qui varient d'une région à une autre (Kazembe *et al.*, 2006). Or, dans la plupart des régions d'Afrique, ces informations de base sur la dynamique de la transmission du paludisme sont carentielles. En conséquence, certaines interventions de lutte antivectorielle sont mises en œuvre sans tenir compte des variations spatio-temporelles et du pic de transmission du paludisme alors que ces facteurs conditionnent la bonne planification et le succès des interventions de lutte antivectorielle (Le Sueur *et al.*, 1997 ; Carter *et al.*, 2000 ; Killeen *et al.*, 2011).

En 2017, il est prévu que toutes les structures éligibles du département de l'Alibori soient traitées avec Actellic 300CS (pirimiphos méthyl) (organophosphoré). La présente étude a donc été initiée en prélude à cette campagne de lutte afin de disposer d'informations sur la variation spatio-temporelle et le pic de la transmission du paludisme dans ce département cible. Ces données de base seront consultées pour une meilleure planification des opérations de pulvérisation. Elles seront également utilisées comme témoin afin de mesurer l'impact de l'intervention après sa mise œuvre.

De façon générale, cette étude vise à recueillir des données de base entomologiques sur le niveau de transmission du paludisme dans l'une des zones d'extension de la PID au Bénin.

Pour y arriver les objectifs spécifiques suivants ont été définis. Il s'agit de :

- Evaluer le comportement de piqûre de *An.gambiae s.l* à Kandi et Gogounou;
- Evaluer le taux d'infectivité de *An.gambiae s.l* à Kandi et Gogounou;
- Evaluer le taux d'Inoculation Entomologique de *An.gambiae s.l* à Kandi et Gogounou. Pour atteindre ces objectifs les hypothèses ci-après ont été formulées:
- *Anopheles gambiae s.l* pique plus à l'intérieur qu'à l'extérieur à Kandi et Gogounou;
- L'infectivité de *Anopheles gambiae s.l.* au *Plasmodium falciparum* ne varie pas d'une commune à une autre ;
- Les taux d'inoculation entomologique (TIE) varient d'une commune à une autre.

4-2- Synthèse bibliographique

4-2-1- Définition du paludisme et cycle de vie du parasite

Le paludisme est une maladie parasitaire endémo-épidémique à manifestation infectieuse due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* et qui sévit dans la plupart des pays tropicaux. Un siècle après la découverte du rôle vecteur des moustiques dans la transmission des *Plasmodia*, le paludisme demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale, avec une incidence annuelle estimée à 500 millions de cas cliniques. Le nombre de victimes directes est évalué à 1 million par an, essentiellement comptées parmi les enfants de moins de 5 ans (Greenwood *et al.*, 2005). Il est transmis le plus souvent d'un individu à un autre par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Le paludisme peut également être transmis par une transfusion sanguine provenant d'une personne infectée. Des dons de sang provenant de personnes à demi immunisées, ne présentant pas de symptômes cliniques, peuvent aussi contenir de parasites du paludisme. Enfin, on peut assister à des cas de paludisme congénital, où la mère contaminée transmet le parasite à son enfant avant ou pendant l'accouchement (OMS, 1996).

Les 4 espèces du genre *Plasmodium* responsables des paludismes humains sont: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. *P. falciparum* est l'espèce la plus virulente causant les formes mortelles de la pathologie et la plus répandue en Afrique subsaharienne (Burkot *et al.*, 1987).

La transmission du paludisme implique trois facteurs : l'homme, le parasite et le vecteur. Les facteurs « homme » et « parasites » ne sont pas limitant, l'homme étant présent sur toute la planète et le parasite pouvant infecter l'homme partout où le climat est favorable au développement de son cycle sporogonique. L'homme est infecté lors d'une piqûre par l'anophèle femelle qui lui transmet le parasite sous forme de « sporozoïte ». Celui-ci reste dans la circulation sanguine pendant une demi-heure et migre rapidement vers le foie. Il pénètre dans l'hépatocyte où il se divise très activement pour donner un corps bleu ou schizonte mûr qui contient près de 400 000 noyaux chez *P. falciparum* et de 10-15 000 pour les autres espèces.

Chaque noyau du schizonte s'entoure du cytoplasme et devient mérozoïte. Cette phase de division cellulaire dure 10 à 15 jours environ et constitue la durée d'incubation du paludisme : c'est la phase exoérythrocytaire. Le schizonte mûr s'éclate et libère la première génération de mérozoïtes qui parasitent certaines hématies pendant que d'autres vont dans la circulation sanguine puis le cycle asexué recommence.

Le temps qui s'écoule entre la pénétration d'un parasite dans une hématie et son éclatement est de 48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*, et 72 heures pour *P. malariae* : c'est la phase érythrocytaire. La formation des gamétocytes dans la rate et la moelle suivie de leur expulsion dans le sang du porteur permettra l'infestation de, l'anophèle femelle pendant son repas sanguin (Malvy *et al.*, 2000). Le vecteur absorbe différents stades du parasite. Les éléments asexués, les trophozoïtes et schizontes sont tous digérés. Seuls les gamétocytes poursuivent leur développement. La transformation des gamétocytes en gamontes survient dans le quart d'heure qui suit leur ingestion par l'anophèle femelle lors du repas sanguin. Une trentaine de minutes après la prise de sang, ceux-ci évoluent rapidement en micro et macrogamètes sexués.

Le cas marquant de ce cycle réside du fait que la fécondation des *Plasmodia* (fusion des gamètes) qui permet la pérennisation du parasite se déroule chez le vecteur et non chez l'hôte vertébré. La fusion des gamètes donne un zygote mobile ou ookinète qui quitte la lumière de l'estomac juste avant la formation de la membrane péri-trophique, processus d'invasion qui déclenche les réponses immunitaires du moustique (Dimopoulos, 2003). L'ookinète localisé dans la paroi externe de l'estomac du moustique s'accroît et se transforme en oocyste renfermant plusieurs sporoblastes qui évoluent en sporozoïtes immatures. Ces derniers, par les mouvements, fragilisent la membrane de l'oocyste qui cède et les libère dans l'hémolymph (Wang *et al.*, 2005).

Les sporozoïtes immatures migrent dans divers tissus du moustique mais préférentiellement dans les glandes salivaires où ils s'accumulent et acquièrent leur stade infectieux. Ils seront injectés lors de la prochaine piqûre du moustique, faisant ainsi démarrer le cycle sporogamogonique chez l'homme. La phase sporogonique du *Plasmodium* chez l'anophèle a une durée de 10 à 25 jours environ, et variable selon la température et l'espèce plasmodiale (Mouchet *et al.*, 2004) (Figure 8).

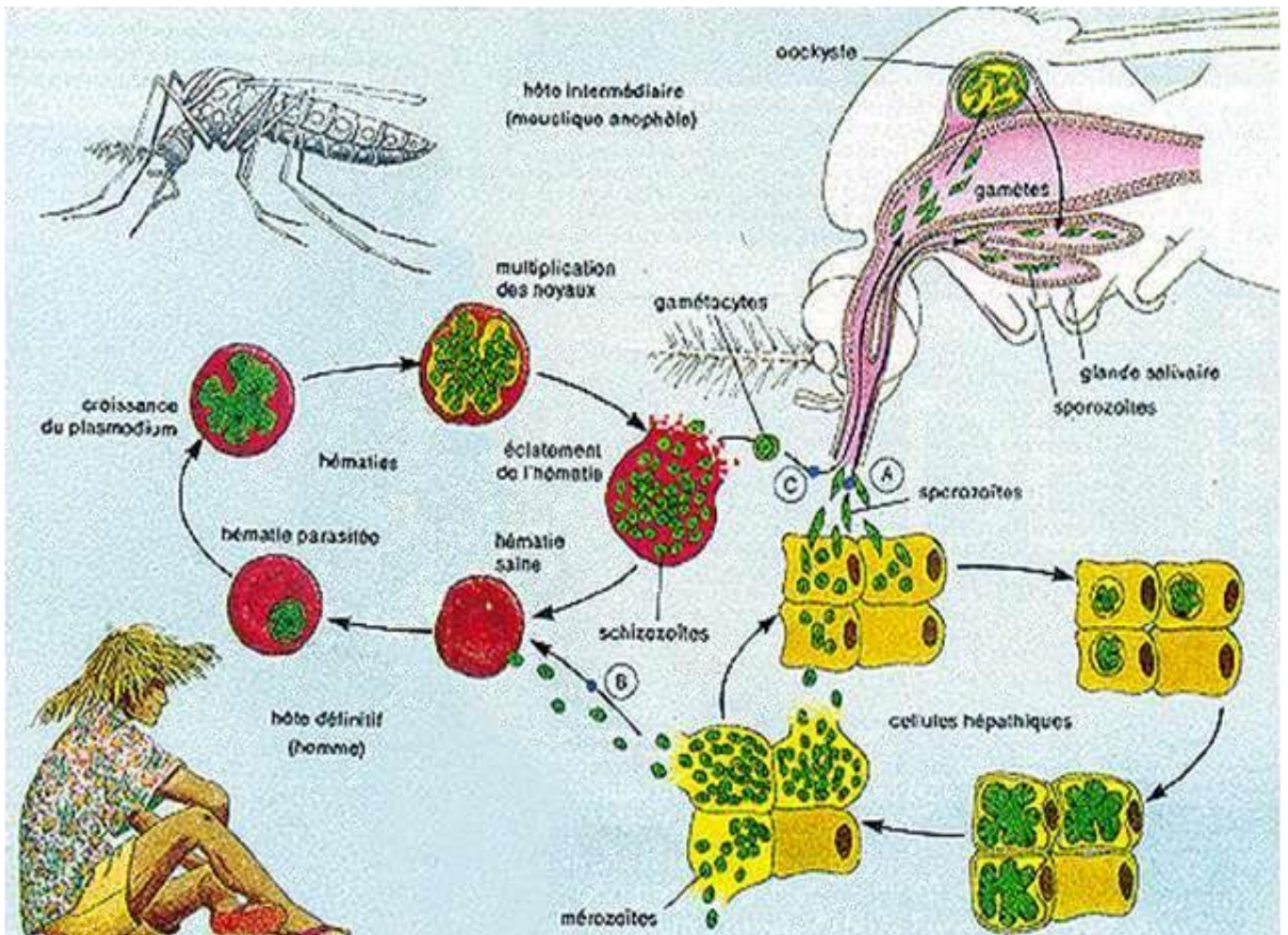


Figure 8 : Cycle de développement du *P. falciparum* (Ghosh et al., 2000)

4-2-2- Faciès épidémiologique du paludisme

Un faciès épidémiologique est un ensemble de lieux et régions où le paludisme présente dans ses manifestations pathologiques des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite. En conséquence, dans ces lieux, la stabilité de la maladie, la prévalence parasitaire, l'incidence clinique et les paramètres entomologiques définis par l'indice de stabilité du paludisme y sont similaires. On distingue ainsi des « faciès primaires » stables, intermédiaires et instables. Dans les zones de transmission élevée et régulière (de l'ordre d'une centaine à quelques centaines de piqûres infectantes par personne et par an), la morbidité et la mortalité sont concentrées chez les jeunes enfants. C'est la situation de paludisme stable », ou l'indice de stabilité est supérieur à 2,5 et la transmission et l'éradication du parasite est difficile (Macdonald 1955). Dans cette zone, la prémunition est acquise tôt dans l'enfance. Dans les zones où la transmission est habituellement moins importante (de l'ordre d'une à quelques dizaines de piqûres infectantes par personne et par an) avec un indice de stabilité compris entre 0,5 et 2,5, on parle de stabilité moyenne ou intermédiaire. Il peut exister de brefs pics de transmission intense et de grandes variations

saisonniers dans l'aspect épidémiologique du paludisme. La morbidité et la mortalité touchent alors des enfants jeunes mais aussi plus âgés; les adultes sont plus souvent malades. La prémunition est lente à s'établir.

Dans les conditions où la transmission est très basse (moins une piqûre infectante par personne et par an) ou interrompue pendant plusieurs années, la prémunition ne peut s'établir durablement et le paludisme peut se manifester sur le mode épidémique. La morbidité et la mortalité concernent alors indistinctement toutes les classes d'âge de la population. C'est le « paludisme instable » avec un indice de stabilité inférieur à 0,5. Appliqués à un continent, ces faciès permettent de découper celui-ci en strates épidémiologiques. C'est ainsi qu'il est convenu de diviser l'Afrique au Sud du Sahara en six strates majeures : équatoriale, tropicale, sahélienne, subdésertique, australe et montagnarde. Il faut tenir compte de modulateurs naturels de la transmission (cours d'eau, retenues et salinité, nature des sols) et des modulations induites par l'homme (déforestation, barrages, irrigation, stabulation des bétails, urbanisation et lutte antivectorielle) qui peuvent changer radicalement les conditions de transmission (jusqu'à l'éradication dans certaines îles tropicales ou la réintroduction sur le mode épidémique après arrêt du contrôle) (Bonneville *et al.*, 2006).

4-2-3- Agents vecteurs du paludisme : les anophèles

Le paludisme est une maladie à transmission vectorielle. Il est transmis par des moustiques du genre *Anopheles*. Les anophèles ont une répartition quasiment mondiale (Kiszewski *et al.*, 2004) qui dépend de certaines caractéristiques éco-climatiques. Jusqu'à nos jours, 484 espèces réparties sur l'ensemble des 5 continents ont été décrites, environ 70 espèces d'anophèles ont été impliquées dans la transmission des plasmodies humaines (Kiszewski *et al.*, 2004). En Afrique, au sud du Sahara, une dizaine d'espèces d'anophèles est directement impliquée dans la transmission du paludisme mais seuls deux grands complexes d'espèces assurent la presque totalité de cette transmission : *An. gambiae* Giles, 1902 et *An. funestus* Giles, 1900 (Darriet, 1998). Le complexe *An. gambiae* comporte 7 espèces jumelles : *An. gambiae* s.s, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* A et *An. quadriannulatus* B (White, 1974; Hunt *et al.*, 1998). Le groupe *An. funestus* quant à lui comporte six espèces jumelles : *An. vaneedeni*, *An. rivulorum*, *An. parensis*, *An. lesoni*, *An. rivulorum-like* et *An. funestus* s. s. Seule cette dernière est anthropophage et joue un rôle dans la transmission du paludisme (Darriet, 1998).

4-2-3-1- Position systématique de *An. gambiae s.l.*

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

Règne	: Animal
Embranchement	: Arthropodes
Classe	: Insectes
Sous-classe	: Ptérygotes
Section	: Oligonéoptères
Super-classe	: Mécoptéroïdes
Ordre	: Diptères
Sous-ordre	: Nématocères
Famille	: Culicidés
Sous-famille	: Anophélinés
Genre	: <i>Anopheles</i>
Sous-genre	: <i>Cellia</i>
Série	: Pyretophorus
Espèce	: <i>Anopheles gambiae s.l.</i>

4-2-3-2- Biologie de *An. gambiae s.l.*

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, larve, nymphe) ;
- La seconde est aérienne et concerne l'adulte ou imago.

La femelle pond les œufs isolément à la surface de l'eau. Ces œufs de forme plus ou moins ovoïde, sont pourvus latéralement de flotteurs, leur permettant de conserver une position horizontale. Après 1 à 3 jours, l'œuf éclot donnant une larve qui mesure à peine un millimètre, mais elle subit trois mues consécutives qui, par les modifications morphologiques qu'elles entraînent, la conduisent au quatrième stade ou larve adulte. A la fin du stade larvaire survient la mue nymphale. Le stade nymphal dure souvent moins de 48 heures, et l'adulte émerge au terme de ce stade. La durée de développement des stades pré-imaginaux varie de 8 à 12 jours suivant les espèces et les conditions du milieu. Après l'émergence, les femelles se reposent de 12 à 24 heures et les mâles pendant 3 jours pour que leur exosquelette se durcisse et que les organes reproducteurs se mettent en place. Après le troisième jour de leur vie imaginale, les mâles essaient au crépuscule, puis s'accouplent avec des femelles âgées de un à deux jours. Les femelles ont besoin des protéines contenues dans

le sang prélevé pour assurer le développement de leurs ovaires. La durée du cycle trophogonique est de l'ordre de 3 à 4 jours pour le premier cycle qui comporte une phase prégravidique 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.

4-3- Méthodologie

4-3-1- Zone d'étude

L'étude sera réalisée dans deux communes (Kandi et Gogounou) dans le département de l'Alibori. Dans ce département, le climat est de type soudanien avec deux saisons par an : une saison des pluies (Mai à Octobre) et une saison sèche (novembre à Avril). La pluviométrie varie entre 700 mm et 1 200 mm avec de fortes précipitations entre juillet et septembre. Ces deux communes sont traversées et arrosés par les fleuves Alibori et Sota avec les températures les plus extrêmes oscillant entre 18°C et 40°C.

4-3-2- Matériels et Méthodes

4-3-2-1- Méthodes d'échantillonnage des moustiques

Cet échantillonnage sera fait suivant différentes techniques et en fonction du type d'étude.

4-3-2-1-1- Capture de nuit sur homme

Cette méthode d'échantillonnage sera utilisée pour évaluer le niveau de la transmission du paludisme dans les deux communes. Dans chacune des communes, une zone centrale et une zone périphérique seront choisies et dans chaque commune, deux cases seront identifiées par zone pour la collecte des moustiques. Des captures mensuelles de moustiques agressifs seront réalisées dans les deux zones à l'aide des tubes à hémolyse de 21h à 05h du matin, sur des sujets humains volontaires (captureurs) qui, au préalable, ont donné leur consentement favorable pour le déroulement de l'activité. Deux volontaires captureront par habitation, soit huit captureurs par commune. Les captureurs jouant le rôle d'appât humain, se muniront de torche et captureront les moustiques qui se posent sur leurs jambes dénudées avant que ceux-ci ne les piquent. Deux équipes de quatre captureurs chacune travailleront à l'intérieur et à l'extérieur des habitations sélectionnées. Les captureurs effectueront une rotation dans les différentes habitations pour éviter les biais liés à leur habileté ou à leur attractivité individuelle. Les spécimens collectés seront référencés et regroupés en fonction de certaines informations que sont la localité, la date, l'heure de capture, la maison et le lieu de capture (à l'intérieur ou à l'extérieur des maisons). Deux nuits de collecte des moustiques seront organisées par mois. Dans chaque commune, Les données enregistrées permettront d'évaluer la densité agressive

(PHN), l'âge physiologique, le cycle d'agressivité et le taux d'inoculation entomologique des vecteurs (TIE).

4-3-2-1-2- Capture par aspersion d'insecticide à l'intérieur des maisons

Cette méthode permettra la collecte des spécimens de moustiques qui sont au repos dans les habitations dénommées encore faune résiduelle. Elle consiste à étaler des draps blancs dans les chambres qui sont après fermées et à pulvériser de l'insecticide à base de pyréthrianoïde non rémanent dans la pièce en insistant au niveau des issues et des points de cachette (toit, portes, fenêtres, dessous des couchettes) pour « dénicher » les moustiques et éviter au maximum leur sortie. Au bout d'un quart d'heure, les moustiques en général tombent, morts ou assommés, sur le drap et sont ensuite collectés. Cette technique permettra de collecter surtout les femelles à différents niveaux de réplétion (gorgées, semi-gravides et gravides).

La récolte de la faune résiduelle permettra d'avoir une estimation de la densité totale des espèces de moustiques dans les maisons. Les anophèles vecteurs collectés seront classés en fonction de l'état physiologique de leur abdomen.

4-3-2-1-3- Identification et traitement des moustiques

Après chaque capture, les moustiques collectés seront comptés et séparés en *Culicinae* et *Anophelinae* à l'aide de la loupe binoculaire. Les anophèles seront mis dans des gobelets pour identification selon la clé de Gillies et de Meillon (1968) et de Gillies & Coetzee (1987). Les ovaires d'une partie des femelles de *An. gambiae s.l.* capturés sur appât humain seront disséqués pour déterminer le taux de parturité, en observant le degré d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). Les spécimens de *An. gambiae* seront conservés séparément selon le lieu de capture dans des tubes eppendorf étiquetés contenant du silicagel à 20°C avant leur analyse.

Ces moustiques destinés au test d'ELISA–CSP et à la PCR seront divisé en deux parties: la tête thorax pour le test d'ELISA analyse et le reste du corps pour la PCR. La recherche de l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum* sera faite par la méthode de titrage immunoenzymatique (Elisa CSP) décrite par Wirtz *et al.* (1987). Cette dernière permet la détection de l'infection au de *Plasmodium falciparum*) et le calcul des taux d'infectivité.

4-3-2-1-4- Paramètres estimés et analyses des données

Les paramètres entomologiques qui seront évalués dans l'étude sont les suivants: 1) le taux de piqûre sur homme (ma) défini comme le nombre moyen de piqûres reçues/homme/nuit; 2) le taux d'infection qui est la proportion de moustiques trouvés positifs à l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum*; 3) Le taux de parité déterminé en divisant le nombre de moustiques pares sur le total disséqué x 100; 4) le taux d'inoculation entomologique (TIE), variable clé exprimant le niveau de transmission du paludisme qui se définit comme le nombre de piqûres infectantes reçues/homme/nuit. Il est le produit du taux de piqûre

et du taux d'infectivité. Les données seront analysées avec le logiciel de statistiques R, version 2.8. La méthode de calcul des intervalles de confiance de Poisson (Rothman, 2012) sera utilisée pour estimer les intervalles de confiance des taux d'agressivité (HBR) et des taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. gambiae s.l.* La méthode binomiale de calcul des intervalles de confiance (Rothman, 2012) sera utilisée pour estimer les intervalles de confiance des taux de parturité et d'infectivité de *An. gambiae s.l.* Les tests de comparaison des proportions seront utilisés pour comparer les taux d'infectivité et de parturité. Une valeur de $p < 0,05$ sera considérée comme significative.

4-4- Résultats attendus

Les résultats escomptés à la fin de cette étude sont :

- Les taux de piqûre de *An. gambiae s.l.* sur homme (ma) sont connues pour les communes de Kandi et Gogounou ;
- Les taux d'infection de *An. gambiae s.l.* à l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum* sont des parametres disponibles pour les communes de Kandi et Gogounou ;
- Les taux de piqûre infectante de *An. gambiae s.l.* sur homme (TIE) sont connues pour les communes de Kandi et Gogounou ;

5- Conclusions

Le stage effectué au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) a été très enrichissant. Mes attentes ont été largement comblées. Le contact avec le monde de la recherche m'a permis d'approfondir mes connaissances sur plusieurs thématiques, notamment sur la dynamique de la transmission du paludisme. L'étude de la dynamique de la transmission du paludisme en prélude à la mise en œuvre de la PID dans l'Alibori permettra de recueillir des informations qui pourront être utilisées pour guider l'extension de cette stratégie en ciblant d'abord les zones à une transmission courte et aisément couvrable par la durée d'efficacité de Actellic 300CS. Ces données serviront également de témoin dans la mesure de l'impact de l'intervention de la PID.

6-References bibliographiques

1. Aïzoun N, Aïkpon R, Gnanguenon V, Oussou O, Agossa F, Padonou G G and Akogbeto M: Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae sensu lato* from the south and north Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 2013, 6:274.
2. Akogbeto M, 1992. Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin. Thèse de doctorat. Paris 11, 194p.
3. Akogbeto M, Chippaux JP, Coluzzi M, 1992. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin) : étude entomologique. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 10-25 : 233–239.
4. Akogbeto M., DI DECO M.A. Répartition des membres du complexe *Anopheles gambiae* et de leurs variants chromosomiques au Bénin et au Togo, Afrique occidentale. *J Afric Zoology* 1995, 25, 443-54.
5. Akogbeto M, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, Osse R, Agossa FR, Beach R and Sezonlin M: Six years of experience in entomological surveillance of indoor residual spraying against malaria transmission in Benin: lessons learned, challenges and outlooks : From 2008 to 2013, a prevention intervention against malaria based on indoor residual spraying (IRS) was implemented in Benin. From 2008 to 2012, Ficam M®, a bendiocarb-containing product was used for house sp. *Malaria Journal* 2015, 14:242.
6. Akogbéto M, Salako A, Dagnon F, Aïkpon R, Sezonlin M, Patton M, Kouletio M, Thomas P, Beach R: Blood feeding behavior comparison and contribution of two sibling species of *Anopheles gambiae* complex living in sympatry, *An. coluzzii* and *An. gambiae*, to malaria transmission in Alibori and Donga region, northern Benin, West Africa (sous presse).
7. Anthony NM, Benner EA, Rauh JJ, Sattelle DB, 1991. GABA receptors of insects susceptible and resistant to cyclodiene insecticides. *Pesticide Science*, 20: 223–230.

8. Atieli FK, Munga SO, Ofulla AV, Vulule JM, 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*, 5 : 304.
9. Brutus L, Le Goff G, Rasolomaina L G, Rajaonarivelo V, Raveloson A & Cot M : Lutte contre le paludisme dans le moyen-ouest de Madagascar : Comparaison de l'efficacité de la lambda -cyhalothrine et du DDT en aspersions intradomiciliaires. I - Etude entomologique. *Parasite*, 2001, 8, 297-308.
10. Carnevale P, Robert V, 2009. Les anophèles biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD, Marseille, 391p.
11. Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna J.M., Pazart L., Gazin P., et al. Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1988; 81:832–46.
12. Carter R, Mendis K N, Roberts D: Spatial targeting of interventions against malaria. *Bulletin of the World Health Organisation* 2000, 78:1401–1411.
13. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, Carnevale P and Guillet P. Current distribution of pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parassitologia* 1999, 41: 319-322.
14. Cox J, Craig MH, Le Sueur D, Sharp BL: Mapping malaria risk in the highlands of Africa. London/Durban: MARA/HIMAL Technical Report; 1999.
15. Djegbe I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, Akogbéto M, Corbel V. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal* 2011, 10: 261.

16. Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish S R, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Tropica* 2010, 114: 116–122.
17. Gimnig J E, Otieno P, Were V, Marwanga D, Abong'o D, Wiegand R, Williamson J, Wolkon A, Zhou Y, Bayoh M N, Lobo N F, Laserson K, Kariuki S, Hamel M J: The Effect of Indoor Residual Spraying on the Prevalence of Malaria Parasite Infection, Clinical Malaria and Anemia in an Area of Perennial Transmission and Moderate Coverage of Insecticide Treated Nets in Western Kenya. *PLoS ONE* 2016, 11(1): e0145282
18. Govoetchan R, Gnanguenon V, Azondékon R, Agossa R F, Sovi A, Oké-Agbo F, Ossè R, and Akogbéto M: Evidence for perennial malaria in rural and urban areas under the Sudanian climate of Kandi, Northeastern Benin. *Parasites & Vectors* 2014, 7:79
19. Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Osse R, Oke-Agbo F, Azondekon R, Sovi A, Attolou R, Badirou K, Tokponnon FT, Padonou GG, Akogbeto MC: Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malaria Journal* 2014, 13:444
20. Kleinschmidt I, Sharp B, Mueller I, Vounatsou P: Rise in malaria incidence rates in South Africa: small area spatial analysis of variation in time trends. *Am J Epidemiol* 2002, 155: 257-264.
21. Lengeler C and Sharp B: Indoor residual spraying and insecticide treated nets. In: Murphy C, Ringheim K, Woldehanna S, Volmink J editor(s). *Reducing malaria's burden: evidence of effectiveness for decision makers*. Washington: Global Health Council, 2003:17–24.
22. Le Sueur D et al: An atlas of malaria in Africa. *Africa Health* 1997, 19: 23–24.
23. Mabaso M L, Sharp B, Lengeler C: Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health* 2004; 9(8):846–56.
24. Marsh K: Research priorities for malaria elimination. *Lancet* 2010, 376:1626–1627.
25. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J :

Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext 2004, Paris.

N'Guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M: Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin: *Emerg Infect Dis* 2007, 13: 199206.

26. Omumbo JA, Guerra CA, Hay SI, Snow RW: The influence of urbanization on measures of *Plasmodium falciparum* infection prevalence in East Africa. *Acta Trop* 2005, 93 (1): 11-21

27. Padonou GG, 2012. 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. Thèse de doctorat. Benin, 258p.

28. Pierrat C: *Des moustiques et des hommes : les territoires du paludisme à Tori-Bossito (sud du Bénin)*. Phd Thèse de Doctorat de Géographie, Université Paris I Panthéon-Sorbonne, 2010.

29. Protopopoff N, Wright A, West P A, Tigererwa R, Mosha F W, Kisinza W, Kleinschmidt I, and Rowland M: Combination of Insecticide Treated Nets and Indoor Residual Spraying in Northern Tanzania Provides Additional Reduction in Vector Population Density and Malaria

30. PNLP, 2006. Plan stratégique de lutte contre le paludisme au Bénin 2006-2010. Disponible sur : <http://www.rollbackmalaria.org/countryaction/nsp/benin.pdf>.

31. Rodhain F, Pérez C, 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, *Notion d'épidémiologie des maladies à vecteurs*. Ed Maloine, 152p.

32. Roberts D, Curtis C, Tren R, Sharp B, Shiff C, Bate R: Malaria control and public health. *Emerging Infectious Diseases* 2004, 10 (6): 1170–1.

33. Roll Back Malaria: The Global Malaria Action Plan 2012. Available at:

www.rollbackmalaria.org/gmap. 2013.

34. Sovi A, Govoétchan R, Tokponnon F, Hounkonnou H, Aïkpon R, Agossa F, Gnanguenon V, Salako AS, Agossou C, Ossè R, Okè M, Gbénou D, Massougbodji A and Akogbéto M: Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasites & Vectors* 2013, **6**:352.
35. Wang SJ, Lengeler C, Mtasiwa D, Mshana T, Manane L, Maro G, Tanner M: Rapid urban malaria appraisal (RUMA) II: Epidemiology of urban malaria in Dar es Salaam (Tanzania). *Malar Journal* 2006, **5**:29.
36. WHO. Evaluation de la santé. *Rapport sur la Santé dans le monde. La vie au 21^e siècle, une perspective pour tous*, World Health Organisation (ed), Genève Suisse, 1998, 43-65.
37. 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.
38. WHO, 2006. Paludisme : lutte antivectorielle et protection individuelle : rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS. *Organisation mondiale de la Santé*, Genève.
39. WHO: Global Malaria Programme 2006. Indoor Residual Spraying: Use of Indoor Residual Spraying for Scaling Up Global Malaria Control and Elimination.
40. WHO: Position Statement. Geneva: World Health Organization, 2006.
41. WHO: Global Malaria Programme 2007. Insecticide-Treated Mosquito Nets: A Position Statement. Geneva: World Health Organization, 2007.
42. WHO: World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015
[http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2015/en/].
43. Yadouleton A, Asidi A, Djouaka R, Braïma J, Agossou C, Akogbetto M: Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal* 2009, **8**: 103.

Annexe

PROTOCOLES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE EN USAGE DANS L'UR CCPV

ELISA – CSP (Circumsporozoite protein de Plasmodium)

D'après Wirtz, Burkot et al. Technique Fontenille LIN Mpl 2002

01 - SI NECESSAIRE PREPARER LES TAMPONS PBS - BB - TWEEN 20 - NP 40 +BB 02

- PREPARER LES MOUSTIQUES (Tete - Thorax dans tube numéroté)

* Ajouter 20 ul de NP 40/BB Laisser au moins **1 H** (ou la nuit au réfrigérateur)

03 - PREPARER LE PLAN DE LA PLAQUE SUR LA FEUILLE (N° des moustiques, date, ...)

04 - **BROYER** LES MOUSTIQUES : 2 fois 190 ul de BB (conservation des tubes a - 20°C)

05 - SI NECESSAIRE RECONSTITUER LES ACm de capture (cf. fiche), garder à -20°C

06 - SENSIBILISER LES **PLAQUES ELISA**

a) Preparer les solutions d'ACm de capture aux dilutions voulue : il faut faire les essais de dilution à chaque nouvelle commande

b) – vortexer

CAPTURE Pour 1 plaque Pour 3 plaques

p. falciparum : 15 ul/5 ml **PBS** f : 45 ul/15 ml PBS

p. vivax 210 : 5 ul/5 ml PBS v 210: 15 ul/15 ml PBS

p. vivax 247 : 10 ul/5 ml PBS v 247 : 30 ul/15 ml PBS

p. malariae 60 ul/5 ml PBS m : 180 ul/15 ml PBS

p. ovale 15 ul/5 ml PBS o : 45 ul/15 ml PBS

b) Mettre 50 ul/puits (à pipette 8 canaux, pte jaune) de chaque **ACm de capture**

* **SCREEN** : melange des plasmodiums à tester (n x 50 ul)

* **monospecific** : uniquement du plasmodium etudie (1 x 50 ul) Laisser la nuit sur la paillasse (ou le W.E. a 4°C).

07 - **VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER**

08 - **METTRE** 200 ul de BB par puits (screen ou monospecific) pendant **1 H** sur paillasse. Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tete Thorax dans BB)

09 - **VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER**

10 - **METTRE** 50 ul du **broyat de moustique** par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit. Laisser pendant **2 H** sur paillasse.

11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les **ACm CONJUGUES**, si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)

12 - VIDER LA PLAQUE. **LAVER 2 FOIS AU PBS/TWEEN 20**

13 - METTRE 50 ul/puits de l'**ACm CONJUGUE**, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 ul) LAISSER **1 H** sur paillasse ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, il faut faire les essais de dilution à chaque nouvelle Commande

CONJUGUES Pour 1 plaque Pour 3 plaques

p. falciparum : 7,5 ul/5 ml **BB f** : 22,5 ul/15 ml **BB**

p. vivax 210: 10 ul/5 ml **BB v 210** 30 ul/15 ml **BB**

p. vivax 247 : 2 ul/5 ml **BB v 247** : 6 ul/15 ml **BB**

p. malariae 15 ul/5 ml **PBS m** : 45 ul/15 ml **PBS**

p. ovale 15 ul/5 ml **BB o** : 45 ul/15 ml **BB**

14 - Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le **SUBSTRAT de la peroxydase** (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

* 5 mg d'**Ortho-tolidine** dans 0,25 ml de N, N-**diméthyl formamide**

* 30 ml de **Tampon citrate**

* 12 ul de **H₂O₂** a 10% (ou 4 ul a 30%, ou 6 ul a 20%).

15 - VIDER LA PLAQUE. **LAVER 4 FOIS AU PBS/TWEEN 20**

16 - METTRE 100 ul/puits de **SUBSTRAT**

17 - INCUBER 30 minutes A OBSCURITE SANS TOUCHER (coloration bleue 620 nm)

18 - Blocage par 50 ul d'**acide sulfurique 4N** : Coloration jaune :

19-**Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa**