



REPUBLIQUE DU BENIN

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

-----  
UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

-----  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

-----  
DEPARTEMENT DE ZOOLOGIE

## LICENCE EVOLUTION BIODIVERSITE DES ARTHROPODES ET ASSAINISSEMENT (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 murs imprégnés d'insecticide

Présenté par :

**Thoni Boris SOSSOUKPO**

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 dans ce centre 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, mon papa Thomas SOSSOUKPO pour avoir contribué financièrement à cette étude et ma maman Véronique AMEDJIKO qui a cultivé en moi les vertus de la tolérance et de l'amour du prochain sur fond de tendresse et d'affinité.

## Résumé

La pulvérisation intra domiciliaire d'insecticide (PID) est l'une des méthodes utilisées pour lutter contre le paludisme sur une grande échelle. Malheureusement la rémanence des insecticides utilisés pour la pulvérisation intra domiciliaire diminue au fil du temps compte tenu de la résistance des moustiques. Dans ce rapport de stage, nous avons proposé le thème de recherche intitulé : "Etude de l'évolution du taux de mortalité des populations sauvages *Anophèles gambiae* résistantes au Bénin en fonction du temps d'exposition aux mûrs imprégnés 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 de bio efficacité (test en cône OMS) seront effectués en augmentant le temps d'exposition à plus de 30 minutes (30 minutes, 1 heure, 1 heure 30 minutes et 2 heures). Au bout de 24 h, les moustiques morts et vivants seront décomptés et les mortalités observées pour chaque temps d'exposition seront enregistrées.

**Mots-clés :** Paludisme, *Anophèles gambiae*, résistance, effet larvicide, Pulvérisation intra domiciliaire.

## Summary:

Pulverizing will intra domiciliary of insecticide (PID) is one of the methods used to fight against malaria on a great scale. Unfortunately the remanence of insecticides used for pulverizing will intra domiciliary decreases with the wire of time taking into account the resistance of the mosquitos. In this report/ratio of training course, we proposed the research topic entitled: «Study of the evolution of the death rate of the wild populations *Anopheles gambiae* resistant to Benin according to the durations to ripe impregnated of insecticide " which aims at determining if the duration of the mosquitos resistant to insecticides influenced their death rate. To this end, larval prospections will be carried out in several communes of the Benin. Any tests of bio effectiveness (test in cone WHO) will be carried out by increasing the duration to more than 30 minutes (30minutes, 1heure, 1heure 30minutes and 2heures).At the end of 24h, the dead and alive mosquitos will be deducted and the mortalities observed for each duration will be recorded.

**Key words:** Malaria, *Anophèles gambiae*, resistor, effect larvae, Pulverizing will intra domiciliary

## Liste des sigles et abréviations

**An:** *Anopheles*

**ADN :** Acide Désoxyribose 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 acide

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

**NaCl :** Chlorure de Sodium

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**PCR :** Réaction de Polymérisation en Chaîne

**PID :** Pulvérisation Intra Domiciliaire

**SDS :** Sodium Dodecyl sulfate

**UAC :** Université d'Abomey-Calavi

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Tri de nymphes.....	10
<b>Figure 2</b> : Gorgement de moustiques.....	10
<b>Figure 3</b> : Tube OMS pour test en tube.....	12
<b>Figure 4</b> : Cône OMS.....	13
<b>Figure 5</b> : Mise en place de la moustiquaire.....	14
<b>Figure 6</b> : Broyage de moustiques.....	15
<b>Figure 7</b> : Dissection de l’ovaire à la loupe.....	16
<b>Figure 8</b> : Femelle adulte d’ <i>Anopheles gambiae</i> .....	19

## Table des matières

Remerciements .....	2
Résumé .....	3
Liste des sigles et abréviation.....	4
Liste des figures .....	5
1-Introduction .....	7
2- Objectif du stage .....	7
3-Description du lieu de stage .....	7
3.1. Cadre physique .....	7
3.2. Personnel .....	8
3.3 Thématiques de recherche du lieu de stage .....	8
3-4. Activités menées .....	8
3-4.1. Prospection larvaire et élevage des moustiques.....	9
3-4.2. Tests de sensibilité.....	10
3-4.3. Tests d'efficacités .....	12
3-4-4 Extraction d'ADN de moustique.....	14
3-4-5-Dissection des ovaires et détermination de la parité .....	15
3-5-Difficultés rencontrées .....	16
4-Choix d'un sujet de recherche.....	17
4-1-Introduction.....	17
4-2 Synthèse bibliographiques.....	19
4-2-1 Vecteurs du paludisme .....	19
4-2-2 Résistance des vecteurs aux insecticides.....	20
4-2-3- Pulvérisation intra domiciliaire.....	21
4-3-Méthodologie .....	21
4-3-1 Cadre d'étude .....	21
4-3-2 Méthode d'étude.....	22
4-3-3- Exposition des moustiques aux mûrs imprégnés d'insecticide.....	22
4-4- Résultats attendus.....	22
5- Conclusion .....	22
6- Références.....	24

## **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 l'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 l'hôpital de zone d'Abomey-Calavi-Sô-Ava. 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 qui 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 Armel DJENONTIN, Enseignant-Chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques et Chercheur Associé au CREC;
- Daleb ABDOULAYE, Doctorant en Anthropologie;
- Oriane AÏCHEOU (remplacé ensuite par Anita HOUNMASSE)
- 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 Missérété, 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 Misséréte, de Bonou et de Sème (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. (Figure 1)

A l'insectarium nous faisons l'élevage de différentes souches de moustiques du genre *Anopheles* dans des conditions écologiques bien définies. 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. 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 gramme mélangé dans un bac de 500 ml d'eau de robinet pour 80 larves d'*Anophèles*). Chaque bacs est recouvert de toile moustiquaire rangé l'un après l'autre sur un portoir de grande capacité et interposé dans une salle dont l'humidité varie entre 70 et 80 % dont la température est compris entre 25 et  $30^{\circ}\text{C}$ . Cette température est due à un radiateur de chauffage qui diffuse des calories par rayonnement. Ces larves nymphosent une semaine (en fonction de la température) après la mise en eau. Ces nymphes sont triées chaque jour et sont mises dans une autre cage cubique pour l'émergence des adultes quelques heures après. Les adultes issus de l'émergence sont nourris de 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 2).



**Figure 1:** Tri de nymphes  
Source : Thoni Boris SOSSOUKPO 2018



**Figure 2:** Gorgement de moustiques  
Source : Thoni Boris SOSSOUKPO 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 placé 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 (vert) 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 témoin doit être inférieure à 20%, si celle-ci est comprise entre 5 et 20% la mortalité est corrigée selon la formule d'Abbott :

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



**Figure 3:** Tube OMS pour test en tube

Source : Thoni Boris SOSSOUKPO 2018

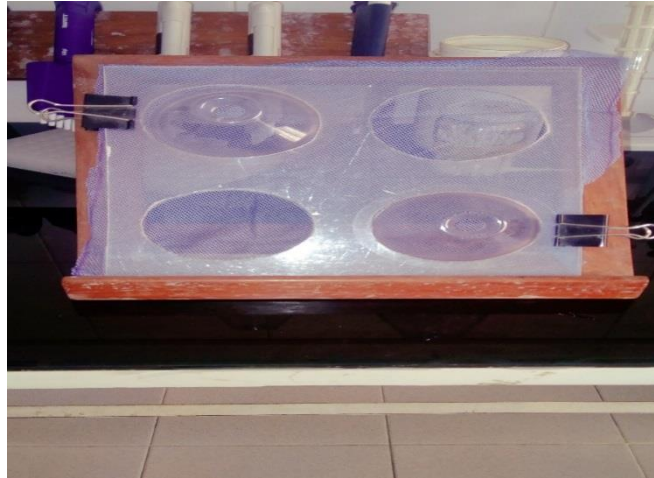
### 3-4.3. Tests d'efficacités

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 biodisponibilité de l'insecticide sur le substrat. Le temps d'exposition des moustiques (à jeun et âgés de 2 à 5 jours, généralement femelles) est de 3 minutes pour les moustiquaires imprégnées avec 5 individus dans des cônes standardisés par l'OMS (figure 4) et de 30 minutes pour les autres supports (terre, bois). 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 sont corrigée selon la formule d'Abbott.



**Figure 4 : Cône OMS**  
Source : Thoni Boris SOSSOUKPO 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 ce 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 5). Le cobaye maintenu en contention est disposé dans une cage grillagée dans le petit compartiment et les tulle 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 (9 heures). Le lendemain matin les femelles sont dénombrées dans les deux compartiments et classées selon ceux qui 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:** Mise en place de la moustiquaire pour le test en tunnel  
Source : Thoni Boris SOSSOUKPO 2018

#### **3-4-4 Extraction d'ADN de moustique**

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. Comme protocole nous avons par exemple le protocole CTAB 2%, le protocole DNazol, le protocole DEB et le protocole Livak. C'est le protocole Livak que nous avons utilisé pour extraire l'ADN.

Lors du déroulement de la manipulation, le tampon Livak est chauffé à 65°C pendant 15 min dont 50 µl ont servi pour broyer (à l'aide d'un piston) le moustique qui est préalablement mis dans un tube eppendorf de 1.5 ml et 50 µl pour rincer le piston (figure 6). Le broyat est immédiatement mis dans un bain marie à 65°C pendant 30 min ce qui va permettre la lyse cellulaire. On a ensuite séparé l'ADN des autres protéines en ajoutant 14 µl de l'acétate-k-8M au broyat qu'on a bien homogénéisé puis incubé sur de la glace pendant encore 30 minutes. Ce mélange acétate-broyat est centrifugé à 13000 rpm pendant 20 minutes ce qui nous a permis d'avoir un surnagent. Ce surnagent est transféré dans un autre tube eppendorf auquel on a ajouté 200 µl d'éthanol à 100% pour permettre la précipitation de l'ADN après avoir fait une centrifugation à 13000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnagent est donc vidé et le culot est lavé avec de l'éthanol glacé à 70% pendant une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm.

Enfin l'éthanol est vidé, puis le culot d'ADN est laissé sécher pendant environ 1 heure puis resuspendu dans 20  $\mu$ l d'eau bi distillée pour d'éventuelle caractérisation moléculaire.

### **Composition du livak**

1.5 ml 5M NaCl

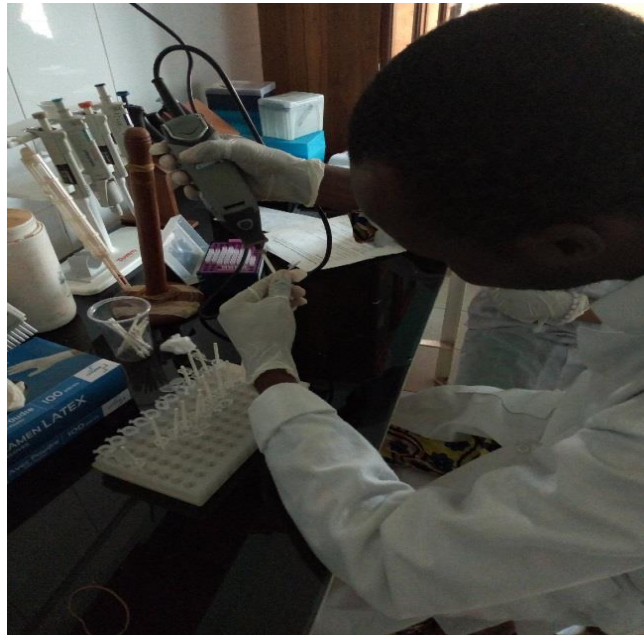
5.8 g sucrose

1.57g tris

10.16 ml 0.5M EDTA

2.5 ml 20% SDS

Qsp 100ml d'eau. Filtrer, stériliser et aliquoter (1.5ml). Conserver à  $-20^{\circ}\text{C}$



**Figure 6:** Broyage des moustiques

Source : Thoni Boris SOSSOUKPO 2018

### **3-4-5-Dissection des ovaires et détermination de la parité**

La dissection des ovaires de moustique femelle (figure 7) 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 gorgées se prêtent à cette 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 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 attaché 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 7: Dissection de l'ovaire à la loupe

Source : Thoni Boris SOSSOUKPO

### 3-5-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 aux nombres 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 l'insuffisance de tunnel, ce qui ne permet pas de tester plusieurs moustiquaires à la fois.

## 4-Choix du sujet de recherche

### 4-1-Introduction

Le paludisme est une maladie parasitaire fébrile causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique du genre *Anophèles*. Les principaux vecteurs du paludisme rencontrés sont les membres du complexe *Anopheles gambiae*, abondant surtout en saison pluvieuse, et *Anopheles funestus*, plus fréquent en saison sèche (Toure, et al. 1979). Ce modèle de répartition temporelle des vecteurs favorise la transmission continue du paludisme pendant toute l'année. Ainsi on parle de transmission par relai (Sangare D., 2000). Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique frappant surtout les pays intertropicaux, qui pour la plupart, sont pauvres. Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique frappant surtout les pays intertropicaux, dont 81% en Afrique soit 174 millions. Le nombre de décès dû au paludisme est estimé à 655000 pour l'année 2010, dont 91% en Afrique. A l'échelle mondiale, 86% des décès imputables au paludisme ont frappés des enfants de moins de 5 ans (OMS, 2011). Au Bénin, l'incidence cumulée du paludisme simple et grave est de 17% en 2013. La maladie représente 39,7% des causes de recours aux soins dans les formations sanitaires et se situe au premier rang des principales affections dont souffrent les communautés en 2014. Chez les enfants de moins de 5 ans ce pourcentage est de 56,1%. Le paludisme est la première cause d'hospitalisation (29, 2%) et de décès (26,0%) au cours de la même année. Les plus fort taux de positivité sont enregistrés dans les départements du Zou, Mono, Couffo, Atacora, Donga et Borgou. Les plus faibles taux sont enregistrés dans les départements de l'Ouémé, Plateau, l'Atlantique, Littoral, Colline, Alibori (MS, 2016). La prise en charge de la maladie continue d'engendrer pour les populations déjà vulnérables des dépenses catastrophiques de santé les plongeant davantage dans l'extrême pauvreté. 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 (MS, 2005 ; OMS, 2001). Pour atteindre tous ces objectifs, l'OMS recommande de lutter simultanément contre le vecteur et contre le parasite. Ainsi, au Bénin, comme dans beaucoup d'autres pays en Afrique au Sud du Sahara, le plan stratégique national de lutte contre le paludisme repose depuis lors sur 3 composantes majeures à savoir : le traitement curatif précoce par les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) ; le Traitement Préventif Intermittent (TPI) par

la Sulfadoxine-Pyriméthamine chez la femme enceinte ; la lutte anti vectorielle. Cette dernière est basée sur l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MILD), la Pulvérisation Intra domiciliaire (PID) d'insecticide et l'épandage des larvicides biologiques tels que *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (Djenontin A, 2011 ; PNLP, 2005).

Afin de faire reculer cette maladie au Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a, dans le cadre d'un projet pilote initié par l'USAID, réalisé entre 2008 et 2010, quatre campagnes de pulvérisation intra domiciliaire (PID) dans quatre communes du département de l'Ouémé en utilisant comme insecticide le bendiocarb. Ces campagnes ont abouti à une réduction de 94% de piqûres de moustiques infectés et à une baisse des cas de paludisme grave de 70% (Akogbéto M, 2011). Cette étude se place dans le cadre du suivi de l'efficacité, dans le temps, des surfaces traitées avec l'insecticide pour tuer les moustiques. Cependant, en raison d'une rémanence du produit qui peut varier de 2 à 9 mois en fonction de l'insecticide, de la formulation et du substrat, les PID nécessitent d'être régulièrement renouvelées. La rémanence d'un insecticide étant connue comme une perte d'efficacité, quel sera donc l'évolution du taux de mortalité des populations sauvages de *Anopheles gambiae* résistantes lorsqu'on augmente le temps d'exposition de plus de 30 minutes recommandé par l'OMS ?

### **Objectif général**

Etudier l'évolution du taux de mortalité des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* résistantes, lorsqu'on augmente le temps d'exposition de plus de 30 minutes recommandé par l'OMS.

### **Objectifs spécifiques**

- Déterminer l'influence du temps d'exposition sur le taux de KD des moustiques sauvages au mur imprégnés d'insecticide ;
- Déterminer l'influence du temps d'exposition sur le taux de mortalités des moustiques sauvages au mur imprégnés d'insecticide ;

## Hypothèse

- Le taux de KD varie en fonction du temps d'exposition des moustiques sauvages au mur imprégnés d'insecticide ;
- Le taux de mortalité varie en fonction du temps d'exposition des moustiques sauvages au mur imprégnés d'insecticide ;

## 4-2 Synthèse bibliographique

### 4-2-1 Vecteurs du paludisme

Les moustiques (Diptera : Culicidae) constituent les vecteurs les plus importantes familles d'agents pathogènes. Ils sont des Arthropodes appartenant à la classe des Insectes, l'ordre des Diptères, au sous ordre des Nématocères et à la grande famille des Culicidés. Cette famille comporte plus de 3450 espèces et sous espèces regroupées en trois sous familles : les Toorhynchitinae, les Anophelinae et les Culicidés. 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 *Anopheles gambiae* (figure 8), *Anopheles merus*, *Anopheles melas*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles bawambae* et *Anopheles quadriannulatus*.



**Figure 8** : Femelle adulte d'*Anopheles gambiae*

**Source** :(en.wikipedia.org/wiki/file :anophelesgambiaemosquito.jpg) Avril 2011

## **4-2-2 Résistance des vecteurs aux insecticides**

### **4-2-2-1 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).

### **4-2-2-2 Différents mécanismes de résistance**

#### **✓ Résistances de comportement**

Elle résulte du changement de comportement d'une population endophile et/ou anthropophile pour un comportement exophile et/ou zoophile et vice versa. Elle semble être le résultat de la présence spontanée de plusieurs espèces. Certaines d'entre elles ont disparu sous l'impact de la lutte insecticide et d'autres les ont supplantées parce que plus ou moins vulnérables aux traitements. En Afrique du Sud et au Swaziland, *Anophèle arabiensis* avait disparu et seul était présent *Anophele quadriannulatus*, zoophage et exophile. Les 2 espèces étant confondues dans l'entité *Anophele gambiae*, il a été conclu qu'*Anophèles gambiae* était devenu exophile et ne piquait plus l'homme. En fait, jusqu'ici, il n'y a aucune preuve de résistances de comportement.

#### **✓ Résistances physiologiques**

Elles résultent de l'apparition de mutations, à une très basse fréquence dans des populations d'insectes. Lors des traitements insecticides massifs ces mutants sont avantagés et tendent à remplacer la population initiale. Ces mutations peuvent concerner :

- la détoxification enzymatique des insecticides par des estérases, mono-oxygénases, transférases et cytochrome P450;
- Des mutations du site d'action des insecticides (récepteurs de l'acide gamma-amino-butyrique ; GABA) pour la dieldrine ;
- L'altération du canal de sodium (gène *kdr* –*knock-down résistance*) pour le DDT et les pyréthrinoïdes;
- La modification des acétylcholinestérases pour les organophosphorés et les carbamates.

### ✓ **Attitude face aux résistances**

La résistance à un insecticide n'implique pas le rejet de l'arsenal de lutte anti vectorielle. Outre son action létale directe, elle agit aussi par son effet répulsif, immédiat ou différé. Plusieurs stratégies plus ou moins sophistiquées, ont été proposées pour retarder le développement de la résistance :

- rotation d'insecticides
- mosaïques d'applications
- mélange d'insecticides ou zones de protection des populations sensibles.

### **4-2-3- Pulvérisation intra domiciliaire**

Il s'agit d'une méthode de lutte anti vectorielle très employée. L'effet principal des insecticides est de tuer les moustiques quand ils pénètrent dans les maisons en quête de repas de sang et/ou se reposent sur les surfaces traitées (moustiques endophages et/ou endophiles). Les pulvérisations ne sont ni efficaces, ni utiles pour lutter contre les vecteurs qui préfèrent se reposer à l'extérieur des habitations (moustiques exophiles). En revanche, elles pourraient être efficaces pour les moustiques qui piquent à l'extérieur (moustiques exophages) puis entrent dans les maisons pour se reposer après leur repas (moustiques endophiles). Les pulvérisations d'insecticides à effet rémanent dans les habitations sont essentiellement protectrices par l'effet insecticide de masse et l'effet dissuasif. Il s'agit donc d'une méthode de protection communautaire. Le choix de l'insecticide et de sa formulation doit tenir compte de la sensibilité des vecteurs locaux, du support (nature des surfaces traités) et de la durée de rémanence souhaitée du produit, en particulier par rapport à la saison de transmission. Elles ont été utilisées largement lors du programme mondial d'éradication du paludisme avec un succès indéniable dans les zones de transmission instables mais une efficacité plus limitée dans les zones à transmission stables avec des populations de vecteurs en partie exophages. (Anonyme. Indoor résiduel spraying, 2006).

## **4-3-Méthodologie**

### **4-3-1 Cadre d'étude**

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

#### **4-3-2 Méthode d'étude**

Dans différentes communes du Benin, des prospections larvaires seront effectuées et les larves collectées seront ramenées à l'insectarium pour l'élevage. Les adultes obtenus à l'issue de l'élevage seront mis dans une cage destinée pour la réalisation des tests en cône sur le support (mur) imprégné d'insecticide. Les moustiques âgés de 3 à 5 jours seront utilisés pour la réalisation dudit test.

#### **4-3-3- Exposition des moustiques aux mûrs imprégnés d'insecticide**

Les expériences seront réalisées avec des moustiques adultes dont l'âge est compris entre 3 et 5 jours. A cet effet, un cône OMS sera placé sur chaque mur traité dont le bord sera maintenu par un ruban adhésif. Une surface non traitée sera utilisée comme témoin négatif. Dix à quinze (10 à 15) moustiques seront introduits dans chaque cône bouché avec un coton. Les temps d'expositions des moustiques (à jeun et âgés de 3 à 5 jours) qui seront retenus pour cette expérience seront de 30 minutes, 1 heure, 1 heure 30 minutes et 2 heures. Les moustiques assommés après 1 heure (*Knocked down*) seront dénombrés. Un tampon de coton imbibé de solution sucrée à 10% sera déposé sur le tulle de chaque gobelet rangé dans le portoir puis placé en observation pendant 24 heures à une température entre 26 et 28°C et 80% à 100% d'humidité. On dénumbrera aussi les moustiques morts après 24 heures d'observation et on déterminera le taux de mortalité observée dans les lots tests et les lots Témoins

#### **4-4- Résultats attendus**

- L'impact de la variation des taux de KD en fonction du temps d'exposition sera connus;
- L'impact de la variation des taux de mortalité en fonction du temps d'exposition sera connus;

#### **Conclusion**

Bien que les programmes de Pulvérisation Intra Domiciliaire aient affiché un succès impressionnant dans la réduction du paludisme à travers le monde, il existe très peu d'essais bien menés pour permettre la quantification des effets de la Pulvérisation Intra Domiciliaire dans les zones caractérisées par différentes transmissions du paludisme. Les nouveaux essais devraient donc inclure les groupes d'insecticides utilisés pour l'imprégnation des supports du fait de la résistance des moustiques sauvages et de la rémanence des insecticides utilisés pour

l'imprégnation. Des essais de bonnes qualités et de longues durées seront nécessaires sur une grande échelle dans les zones où il n'y a eu que peu ou pas de lutte contre les moustiques. Il est donc souhaitable que des expériences sur les différentes idées développées dans ce rapport soient réalisées.

## 6- Références

**Akogbéto M. (2011):** Entomological Database in Preparation for the Implementation of Indoor Residual Spraying (IRS) in the Department of Atacora. 52. Cotonou: Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 2011.

**Anonyme, Spraying. (2006):** Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. WHO position statement. . WHO /HTM / MAL: 1112.

**Djenontin A. (2011) :** Thèse de Doctorat à l'Université d'Abomey-Calavi, Stratégies de gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme et impact opérationnel en Afrique de l'Ouest.

**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.

**MS (Ministère de la santé). (2005) :** Programme national intégré de lutte contre le paludisme (Un avenir sans paludisme). Plan stratégique FRP au Rwanda 2005-2010.

**MS (Ministère de la santé). (2016) :** Annuaire des statistiques sanitaires années 2016 au Bénin.

**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 Mondial de la Santé). (2011) :** Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde.

**PNLP (Programme National de Lutte Contre le Paludisme au Benin). (2005) :** Politique Nationale de Lutte contre le Paludisme et cadre stratégique de mise en œuvre. *MSP Cotonou Bénin*, 2005, 50p.

**Sangaré D. (2000) :** Dynamique des populations d'*Anopheles gambiae*, d'*Anopheles funestus* et de *Plasmodium falciparum* dans le système de transmission par relais du paludisme à Doneguebougou (Arrondissement central de Kati). ISFRA, Bamako-Mali. These de Doctorat 3e Cycle: Entomologie et Parasitologie.

**Touré Y. (1979) :** Bio-écologie des anophèles (Diptera : culicidae) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali (village de Banambani). Incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft thèse de 3<sup>ème</sup> cycle ; Centre Pédagogique Supérieur.

