

**Ministère de L'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

République du Mali
Un Peuple – Un But – Une Foi



**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET
DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO (USTTB)**

**Faculté de Médecine
d'Odonto-Stomatologie**



ANNEE UNIVERSITAIRE 2011-2012
N°.....



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE

TITRE

**ETUDE ENTOMOLOGIQUE DE BASE EN PRELUDE
A LA PULVERISATION INTRA DOMICILIAIRE
DANS LA COMMUNE RURALE DE BOIDIE CERCLE
DE BAROUELI**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le / /2012

Devant la Faculté de Médecine d'Odonto-Stomatologie

Par M Ladji CAMARA

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr Amagana DOLO

Membre : Pr Guimogo Dolo

Co. Directeur : Dr Mamadou B COULIBALY

Directeur: Pr Sékou Fantamady TRAORE

Cette thèse a été réalisée grâce à l'aide généreuse du Peuple américain (USAID). Le laboratoire de génomique des vecteurs du département d'entomologie est responsable du contenu qui ne reflète pas

DEDICACES

Je dédie ce travail :

-A **ALLAH** (l'inconnu), le tout Puissant Miséricordieux, l'Eternel absolu. Ce travail me donne encore une fois l'occasion de vous remercier et de vous confier sans crainte ni humiliation toute ma vie car aucun refus après votre accord. Oh seigneur, nourrissez-moi de la foi divine et faites de ma force ma foi et de ma foi, ma force (Amen).

-Au Prophète **Mouhammad** Paix et Salut sur Lui, l'irréprochable exemplaire, l'intercesseur du jugement dernier. Dites à votre envoyeur que nous somme de cœur avec vous et que le degré d'estime que nous avons pour vous est immense, afin qu'il nous facilite nos taches ici bas ainsi qu'à l'au-delà (Amen).

-A mes Maitres spirituel **Check Ahmadou Tidiane** et **Check Ahamada Hammaoulah**, vous êtes incontestablement les descendants du prophète Mouhammad. La persistance et l'intensification des stratégies divines que vous avez recommandées sont des preuves concrètes de votre sainteté, car aucun mensonge ne perdure après la disparition du menteur.

A mes parents :

-Mon père feu **Mamadou Baba CAMARA**, cher père vous avez été exemplaire aux yeux de tous vos enfants. Votre honnêteté et votre dignité n'ont jamais fait défaut. Je me rappelle encore il y'a 8 ans quand vous m'avez dis que la durée des études médicales n'ai rien pour une personne d'une grande longévité. Et voilà que dans un clin d'œil vous aurez très bientôt ce que vous avez tant souhaité pour votre fils. Je ne cesserai jamais de vous remercier de tout ce que vous avez faites pour l'unité et le bien être parfait de la famille.

Que Dieu vous accorde son pardon et sa miséricorde (amen).

-Ma mère feu **Fatoumata KONTE**, chère mère vous m'avez tôt laissé dans une nostalgie infinie, mais la lumière de votre image dans mon

cœur me guidera sans doute à jamais. Si je suis encore dans ce monde combatif, bien portant et dynamique ; cela confirme votre bonté et votre générosité. Oh femme simple et de résignation, je ne cesserai jamais de vous remercier.

Que Dieu vous accorde son pardon et sa miséricorde (amen).

-A mes grands parents : Feu Mary, Feu Mamourou, Feu Babou, Feu Badakary, Feu Kokoba, Feu Ladji Oumar, Feue Tenin, Feue Assetou et Maya (CAMARA) ; Fatoumata, Feue Assitan, et Feue Awa (BERTHE).

-A mes tontons et tantes : Fadiga, Karamoko, Feu Baba, Tamba, Djangoba, Mamadou, Feu Bourama, Feu Checknè et Feu Aliou (CAMARA); Kagnini, Manssa, Manh, Sétou, Feue Djénéba, Hawa, Ami, Tata, Payi et Hatoumata...

-A mes oncles : Guy, Feu Babou, feu Sigou, Fousseyni, et Yayi (KONTE)...

-A mes frères et sœurs : Vous m'avez réellement soutenu et respecter, malgré ma difficile période estudiantine ; que Dieu vous soutiennent et vous accorde votre souhait.

-A mes cousins, cousines, neveux et nièces : Je ne pourrai jamais vous oublier après tous les bons moments que nous avons eu à partagé ensemble.

-A mon épouse et bien aimé **Aminata TIRERA**, chère épouse les mots me manquent pour t'apprécier à ta juste valeur ; une chose est quand même sûre, ta présence permanente dans le foyer me prouve la sincérité de ton amour. Retrouves ici chère épouse toute ma reconnaissance et le début de ton réconfort.

-A mes deux enfants **Ibrahim** et **Cheick Hammaoulah CAMARA**, chers fils, vous êtes les plus beaux cadeaux que le seigneur Dieu m'a offerte, vous êtes la lueur de mon réconfort et le but de ma lutte.

-A l'équipe du laboratoire de génomics et proteomics : Dr COULIBALY Mamadou B., Dr DIALLO Brehima, Dr GUINDO Amadou, Dr TRAORE Mohamed Moumine., Dr SOUMARE Harouna, Dr DOUMBIA Sidy, Dr TRAORE Amadou Sékou, Dr Diallo M'bouyé, Mamadou KONATE, Yaya

TRAORE, Bikissou YAGOURE, Fatoumata SISSOKO, Check Oumar CAMARA, Lakamy SYLLA, Ladjì CAMARA et Baba MBARAKOU. Toute ma gratitude envers vous, qui aviez été mes plus proches collaborateurs avec qui j'ai partagé tellement de bon moment.

REMERCIEMENTS

A mon pays le Mali et à ses autorités, d'avoir rendu l'enseignement gratuit.

A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'au supérieur, ainsi qu'à l'ensemble du corps professoral de la FMOS en particulier :

Mr Soumaila BALLO, Mr Diakaridia DIARRA, Mr Mamadou DIAMOUTENE, Professeur Gangaly DIALLO, Professeur Idrissa CISSE dit Idi, Professeur Fangoro SAHARE, Professeur Amagana DOLO Professeur Check Fantamady TRAORE, Professeur Seydou DOUMBIA, Professeur Abdoulaye DIALLO ...

A tout le personnel de la Bibliothèque de la FMOS.

A tous les personnels de la MRTC/DEAP, en particulier mes maitres et collègues : Professeur Check Fantamady TRAORE, Professeur Seydou DOUMBIA, Professeur Amagana DOLO, Dr Mamadou B COULIBALY, Dr Mahamadou DIAKITE, Dr Guimogo DOLO, Dr Yaya COULIBALY, Dr Nafomo SOGOBA, Dr Adama DAO, Dr Mahamadou B TOURE, Dr Ibrahima BABER, Dr Brehima DIALLO, Dr Amadou GUINDO, Dr Mohamed Moumine TRAORE, Dr Sékou TRAORE, Dr Harouna M SOUMARE, Dr Sidy DOUMBIA, Dr Housseini DOLO, Dr Mandjou SACKO, Dr Yaya KASSOGUE, Dr Sibiri SAMAKE, Dr Bourama TRAORE, Dr Seydina DIAKITE, Dr Karim TRAORE, Dr Massiriba KONE, Dr Mbouyé DIALLO, Dr Kaly KEITA, Boureyma CISSE, Dr ALPHA, Dr YARO, Souleymane KAREMBE Yaya TRAORE, Bilkissou YAGOURE, Fatoumata SISSOKO, Lakamy SYLLA, Check Oumar CAMARA, Baba MBARAKOU, Abdallah DIALLO, Moussa DIALLO, Oumou NIARE, Moussa SACKO, Mamadou KONATE, Check Amadou COULIBALY, Ibrahim Moussa SISSOKO dit Genski, Lamine SOUMAORO, Adama Issaka TRAORE, Seydou TIMBINE,... Soyez rassuré de ma profonde reconnaissance.

Aux informaticiens du MRTC/DEAP : Sidy SOUMARE, Mady DIARRA, Amadou DIALLO, Madame SOUMARE Salimata et Issa BAH.

A mon encadreur Dr Amadou GUINDO, veuillez accepter l'expression de ma profonde reconnaissance.

A tous les chauffeurs du MRTC : Abdoulaye KONE, Abdoulaye COULIBALY, Mahamadou KEITA, Yoro SIDIBE, Moro DIAKITE, Moumine DIALLO, Mamadou T. DIALLO, Adama DEMBELE, Bakoro NIARE. Pour votre apport si important à l'étude.

Aux garçons de salles du MRTC.

A toute la population du cercle de Baroueli plus particulièrement des trois villages d'étude pour votre sympathie et votre remarquable collaboration.

Aux captureurs de moustiques et guides des sites d'étude.

A tous le service de Rhumatologie et de Néphrologie du CHU du POINT G.

A tous le service d'Anesthésie et de Réanimation du CHU Gabriel Touré.

A tous les agents de santé du centre de référence de Diéma en particulier le directeur Dr SY, son adjoint Dr SANGARE, Dr KAMATE, mon cher ami Dr Bakary TOUNKARA, le major Yoro DIALLO, et aux infirmiers : DOUMBIA, Moussa DIARRA et Kader SAMPANA.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Recevez ici notre plus grande reconnaissance, partagez avec nous notre plus grande joie, nous ne vous dirons jamais assez MERCI.

A tous ceux que j'aurai oubliés.

HOMMAGE AU MEMBRE DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Amagana Dolo

Professeur de parasitologie-mycologie à la faculté de pharmacie, Chercheur au MRTC, Directeur Adjoint de l'Institut des Sciences Appliquées (ISA) de l'Université des Sciences, Techniques et technologique de Bamako.

Cher Maître c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Votre rigueur scientifique, votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître exemplaire et témoigne aussi de l'importance que vous attachez à la formation. Vos nombreuses tâches ne vous ont pas empêché d'apporter votre contribution à ce modeste travail. Nous en sommes honorés et c'est l'occasion ici de vous dire infiniment merci et croyez en notre reconnaissance et notre grande admiration.

A notre Maître et juge

Professeur Guimogo DOLO

PhD en entomologie-parasitologie médicale, responsable de l'enseignement de la génétique à la FMOS, Chef de l'unité biologie moléculaire du MRTC. Membre du Comité Sahélien des Pesticides, Membre du Comité "Vector Control Working Group" (VCWG) de Roll Back Malaria,

Consultant du Programme Santé de "Earch Institut" de l'Université de Columbia.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Vos critiques et suggestions ont été d'un apport inestimable pour la réalisation de ce document.

Nous avons apprécié vos qualités humaine et scientifique. Votre sens élevé du travail bien fait, votre disponibilité constante et surtout votre patience font de vous un maître respectable et admiré. Trouvez ici toute notre admiration ainsi que notre profond respect.

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Mamadou B. COULIBALY

Docteur en Pharmacie, PhD en sciences biologiques, chef de l'unité génomique et proteomique du MRTC.

Nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques tout au long de cette thèse. Votre rigueur et votre amour pour le travail bien accompli ainsi que votre sens critique ont fait de vous un homme apprécié. Vous constituez un exemple pour la nouvelle génération de chercheur à laquelle nous espérons faire parti. Soyez rassuré de notre profond attachement et de notre entière confiance.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Sékou Fantamady Traoré,

PhD en entomologie médicale,

Professeur de Génétique et de biologie cellulaire

Co-directeur du MRTC

Cher maître, nous vous remercions de la confiance que vous nous avez placée en nous proposant ce travail.

Vos qualités humaines, scientifiques et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un maître respectable et admiré.

Nous sommes très fiers d'être parmi vos élèves. Soyez rassuré, cher maître de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Cycle de développement de plasmodium.....	6
Figure 2: Cycle biologique d'un Anophelinae.....	8
Figure 3: Les différents états de réplétion de l'abdomen des anophèles femelles après un repas de sang.....	1 0
Figure 4: Schémas descriptifs des Moustiques adultes.....	1 1
Figure 5: <i>Anopheles gambiae s.l.</i> lors de la prise de repas de sang.....	1 3
Figure 6: Répartition des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> en Afrique.....	1 5
.....	
Figure 7: Cibles de la lutte anti vectorielle au cours du cycle gonotrophique (d'après Coosman et Carnevale, 1995).....	1 8
Figure 8: Carte du site d'étude, (Source MRTC).....	2 3
Figure 9: Diagramme de traitement des échantillons du spray-catch....	2 7
Figure 10: Diagramme de traitement des échantillons de la CN.....	2 8
Figure 11: Aspect d'ovaire de moustiques disséqués.....	2 9
Figure 12: Schéma du principe de l'ELISA circumsporozoïtique (méthode du sandwich).....	3 1
Figure 13: Schéma du principe de l'ELISA repas de sang (méthode directe).....	3 2
.....	
Figure 14: Technique d'exposition des moustiques aux insecticides.....	3 4
Figure 15: Composition de la faune résiduelle (vectrice et non vectrice) du paludisme par spray catch dans les sites d'étude.....	3 8
Figure 16: Fréquence d' <i>An. gambiae s. l.</i> obtenus par mois et par site d'étude.....	3 9
Figure 17: Composition de la faune non vectrice du paludisme selon la méthode de la capture nocturne (CN) dans les sites d'étude.....	4 0

Figure 18: La densité anophelienne et pluviométrie par site d'étude de juin à octobre 2010.....	4 4
Figure 19: Taux d'infection par site d'étude, de juin à octobre 2010.....	4 5
Figure 20: Agressivité par sites d'étude de juin à octobre 2010.....	4 6
Figure 21: Taux d'anthropophilie d' <i>An. gambiae</i> s.l. durant la période de transmission par site d'étude de juin à octobre 2010.....	4 7
Figure 22: Variations des Taux d'inoculation entomologique par site d'étude de juin à octobre 2010.....	4 8
Figure 23: Etude du taux de piqures sur homme par site d'étude de juin à octobre 2010.....	5 0
Figure 24: Temps de Knock-down (kdt) dans le village de Boidiè.....	5 1
Figure 25: Temps de Knock down (kdt) dans le village de Kamba.....	5 2
Figure 26: Temps de Knock down (kdt) dans le village de Soungola....	5 3
Figure 27: Taux de Mortalité à 24 heures d' <i>An. gambiae</i> s.l exposé aux différents insecticides.....	5 4
Tableau 1: Coordonnées géographiques et populations des sites d'étude à Baroueli.....	25
Tableau 2: Fréquence des espèces et formes moléculaires d' <i>An. gambiae</i> s. l à Boidiè 2010.....	41
Tableau 3: Fréquence des espèces et formes moléculaires d' <i>An. gambiae</i> s. l à Kamba 2010.....	42
Tableau 4: Fréquence des espèces et formes moléculaires d' <i>An. gambiae</i> s. l à Soungola 2010.....	43
Tableau 5: détermination de l'âge physiologique et du taux de parturité par passage dans les sites d'étude.....	49

LISTE ET SENS DES ABREVIATIONS ; SIGLES ET SYMBOLES

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNr** : Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
- ARN** : Acide RiboNucléique
- ARNr** : Acide RiboNucléique ribosomal
- An** : *Anopheles*
- CDC**: Center of disease control
- CSP**: Circum sporozoite protéin
- dATP** : DésoxyriboAdénosine TriPhosphate
- DDT** : Dichloro diphenyl diethylchloro ethane
- dCTP** : DésoxyriboCytosine TriPhosphate
- dGTP** : désoxyriboGuanosine TriPhosphate
- DNS** : Direction nationale de la santé
- dNTPs** : désoxyriboNucléotide TriPhosphate stock
- dTTP** : désoxyriboThymidineTriPhosphate
- EDTA** : Ethylène-Diarnine-TétraAcétique
- ELISA**: Enzyme linked immuno-sorbent assay
- ETS**: Espace Transcrit Externe
- FMOS**: Faculté de médecine d'odontostomatologie
- GA**: Amorce *gambiae*
- GABA**: Gamma-amino-butyric acid
- IAS** : Indice d'antigène sporozoïtique
- IgG** : Immunoglobuline G
- IgM**: Immunoglobuline M
- IGRs**: Insect growth regulators en anglais
- IGS**: Espace Inter Génique
- ITS**: Espace Transcrit Interne
- HR**: Humidité relative
- KD**: Knockdown
- Kdr** : Knockdown résistance
- KDT**: Knockdown time

Km: Kilomètre

m.a: Agressivité

MII : Moustiquaire imprégnée d'insecticide

MRTC: Malaria research and training center

OMS: Organisation mondiale de la santé

pb : paire de bases

P.falciparum : *Plasmodium falciparum*

P. ovale : *Plasmodium ovale*

P. malariae : *Plasmodium malariae*

P. vivax : *Plasmodium vivax*

P. Knowlesi : *Plasmodium knowlesi*

PCR : Polymerase chain reaction

PH : potentiel d'hydrogène

PID: Pulvérisation intra domiciliaire

PM : picomolaire

PTC : Programmable Thermal Cyclers

PMI : President's Malaria initiative

PNLP : Programme national de lutte contre le paludisme

PPN : Piqure par personne par nuit

RBM : Roll back malaria

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

rDNA: ribosomal ADN

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SLIS : Système locale d'information de la santé

s. l: Sens large ou sensu largo

s. s: Stricto sensu

Taq: Thermus aquaticus

TBE: Tris-Borate-EDTA

Tm: melting Temperature

Tris: Trihydroxyméthyl aminométhane

TIE: Taux d'inoculation entomologique

T°: Température

UN: Amorces universelles

UV : Ultraviolet

W.H.O: World Health Organization

USAID : Agence américaine pour le développement international

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

SOMMAIRE

1.	INTRODUCTION.....	1-3
2.	OBJECTIFS.....	4
2.1	Objectif général	4
2.2	Objectifs spécifiques	4
3.	GENERALITE.....	5
3.1	Parasite du paludisme et son cycle biologique.....	5
3.2	Vecteurs du paludisme.....	7
3.2.1	Classification.....	7
3.2.2	Biologie.....	7
3.2.3	Morphologie.....	11
3.2.4	Distribution géographique des membres des complexes <i>Anopheles gambiae</i> et <i>funestus</i> en Afrique.....	12
3.2.4.1	Systématique du groupe <i>Anopheles funestus</i>	12
3.2.4.2	Systématique et distribution du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	13
3.3	Lutte anti vectorielle.....	16
3.3.1	La lutte contre l’anophèle au stade adulte.....	16
3.3.2	La lutte contre l’anophèle au stade larvaire.....	19
3.4	La résistance des vecteurs du paludisme en Afrique.....	19
3.4.1	Définition de la résistance.....	19
3.4.2	Les différents types de résistance.....	19
4.	MATERIEL ET METHODES.....	23
4.1	Sites d’étude.....	23
4.2	Période et type d’étude.....	25
4.3	Techniques de collecte et de traitement des moustiques.....	26
4.4	Recherche d’infections plasmodiale.....	30
4.5	Détermination de l’origine de sang.....	31
4.6	Test d’insecticide.....	32
4.6.1	Matériel	32

4.6.2	Moustiques utilisé pour le test (<i>An. gambiae s.l</i>)	32
4.6.3	Température et humidité relative pendant le test.....	33
4.6.4	Insecticides utilisés pour le test.....	33
4.6.5	Procédure du test.....	33
4.7	Identification moléculaire des moustiques	35
4.8	Paramètres entomologiques mesurés.....	35
4.9	Analyses et interprétations des résultats.....	37
4.10	Considérations éthiques.....	37
5.	RESULTATS.....	38
5.1	Composition de la faune résiduelle dans les sites d'étude....	38
5.1.1	Fréquence d' <i>An. gambiae s. l</i>	39
5.1.2	Composition spécifique de la faune non vectrice du paludisme dans les sites d'étude selon la méthode de la (CN).....	41
5.2	Structure moléculaire de la population vectrice dans les sites d'étude.....	43
5.2.1	Densité et pluviométrie.....	44
5.2.2	Taux d'infection.....	45
5.2.3	Agressivité des vecteurs par spray catch.....	46
5.2.4	Taux d'anthropophilie.....	47
5.2.5	Taux d'inoculation entomologique.....	48
5.2.6	Taux de parturité.....	49
5.2.7	Habitudes trophiques.....	50
5.3	Test de susceptibilité d' <i>An. gambiae s. l</i> aux insecticide.....	51
5.3.1	Temps de knock-down (kdt) dans les sites d'étude.....	52-53
5.3.2	Taux de mortalité après 24 heures des moustiques soumis aux insecticides.....	54
6.	COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....	55
6.1	Composition vectorielle.....	55
6.2	Etudes entomologiques de la transmission.....	55

6.3	Susceptibilité d' <i>An. gambiae</i> s. l aux insecticides.....	57
6.3.1	Susceptibilité aux cinq insecticides testés.....	57
7.	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	58
8.	BIBLIOGRAPHIE.....	59-67

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique du genre *Anopheles*. Cinq espèces de *Plasmodium* sont décrites chez l'homme : *P. falciparum* (Wellch 1897), la plus dangereuse, *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. ovale* (Stephens, 1922), *P. vivax* (Grassi et Feletti, 1890), et *P. knowlesi* qui, initialement décrit chez les primates, a été récemment trouvé infectant pour l'homme (Singh, Kim Sung et *al.* 2004).

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique frappant surtout les pays intertropicaux, qui pour la plupart, sont pauvres. En 2010 il y a eu plus de 216 millions de cas cliniques de paludisme dans le monde, dont 81% en Afrique soit 174 millions. Le nombre des décès dus au paludisme est estimé à 655000 pour l'année 2010, dont 91% en Afrique. À l'échelle mondiale, 86% des décès imputables au paludisme ont frappé des enfants de moins de 5 ans (OMS 2011).

Au Mali, le taux d'incidence du paludisme grave représente 35,41‰ contre 108,98‰ de paludisme simple (SLIS 2010). Il représente également la première cause de décès chez les enfants de moins de cinq(5) ans, et d'anémies chez les femmes enceintes.

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 fraîche (Touré, 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 (Sangaré D., 2000).

La lutte anti vectorielle est la méthode la plus efficace pour prévenir la transmission du paludisme. La lutte chimique par l'utilisation des insecticides à effet rémanent est la plus courante, dominée par l'usage des matériels imprégnés d'insecticide.

Les pyréthriinoïdes forment le seul groupe d'insecticide autorisé par l'OMS dans l'imprégnation des moustiquaires à cause de leur faible toxicité sur les mammifères et de leur rémanence plus élevée (Zaim et al., 2000). Ils représentent aussi la majorité des insecticides (6/12) recommandé par l'OMS dans la pulvérisation intra domiciliaire pour les mêmes raisons évoquées ci-dessus.

Au Mali les stratégies de lutte anti vectorielle sont essentiellement basées sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. Différentes études ont montré l'efficacité de l'utilisation de ces moustiquaires imprégnées sur l'incidence du paludisme (Choi et al. 1995). Récemment la pulvérisation intra domiciliaire a été introduite par la Direction du Programme National de Lutte contre le Paludisme au niveau de trois cercles.

En effet, le Mali, a été sélectionné en décembre 2005 comme un des 15 pays bénéficiaires de l'initiative du président Bush contre le paludisme PMI (President's Malaria Initiative). Le but principal du PMI est de réduire de 50% la mortalité imputable au paludisme dans les pays bénéficiaires. C'est dans le cadre de ce projet que la pulvérisation intra-domiciliaire, composante majeure de la lutte anti vectorielle ayant fait ses preuves dans l'éradication du paludisme, dans les années 1950-60, a été mise en œuvre par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) en 2008.

Le PNLp avec l'appui de PMI a procédé à la pulvérisation intra domiciliaire dans les cercles de Bla et de Koulikoro en 2008. Dans le cadre de l'extention de ce programme le cercle de Barouéli a été

sélectionné. Une intervention d'une telle envergure nécessite au préalable une connaissance du niveau de la résistance des vecteurs aux insecticides qui sont utilisés. Elle nécessite aussi une information sur les paramètres entomologiques de la transmission afin de pouvoir mesurer l'impact de l'intervention. Le phénomène de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides n'est pas nouveau. Des études ont montré que *Anopheles gambiae* est résistant à la perméthrine et au DDT au sud du Mali (Fanello et al. 2003, Tripet et al., en 2006). Il est nécessaire de connaître le niveau de susceptibilité des vecteurs avant la pulvérisation intra domiciliaire (PID), compte tenu du fait qu'il n'y a pas eu d'évaluation antérieure dans le cercle de Barouéli. Il est aussi nécessaire d'évaluer les paramètres entomologiques de la transmission du paludisme. Ainsi la présente étude a été initiée pour déterminer les paramètres entomologiques de la transmission du paludisme et la susceptibilité du complexe *An. gambiae* aux insecticides avant la PID. Elle pourrait fournir des informations au PNLN sur l'efficacité des insecticides à utiliser, et le niveau de la transmission du paludisme.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général :

Evaluer les paramètres entomologiques de la transmission du paludisme et la susceptibilité du complexe *An. gambiae* aux insecticides en prélude à la pulvérisation intra domiciliaire dans le cercle de Barouéli.

2.2. Objectifs spécifiques :

- Déterminer la composition de la faune culicidienne,
- Déterminer les paramètres de base de la transmission avant la pulvérisation intra domiciliaire,
- Déterminer le niveau de susceptibilité d'*An. gambiae s.l.* aux insecticides selon la méthode standard de l'OMS.

3. GENERALITES

3.1 Parasite du paludisme et son cycle biologique

- **Le parasite**

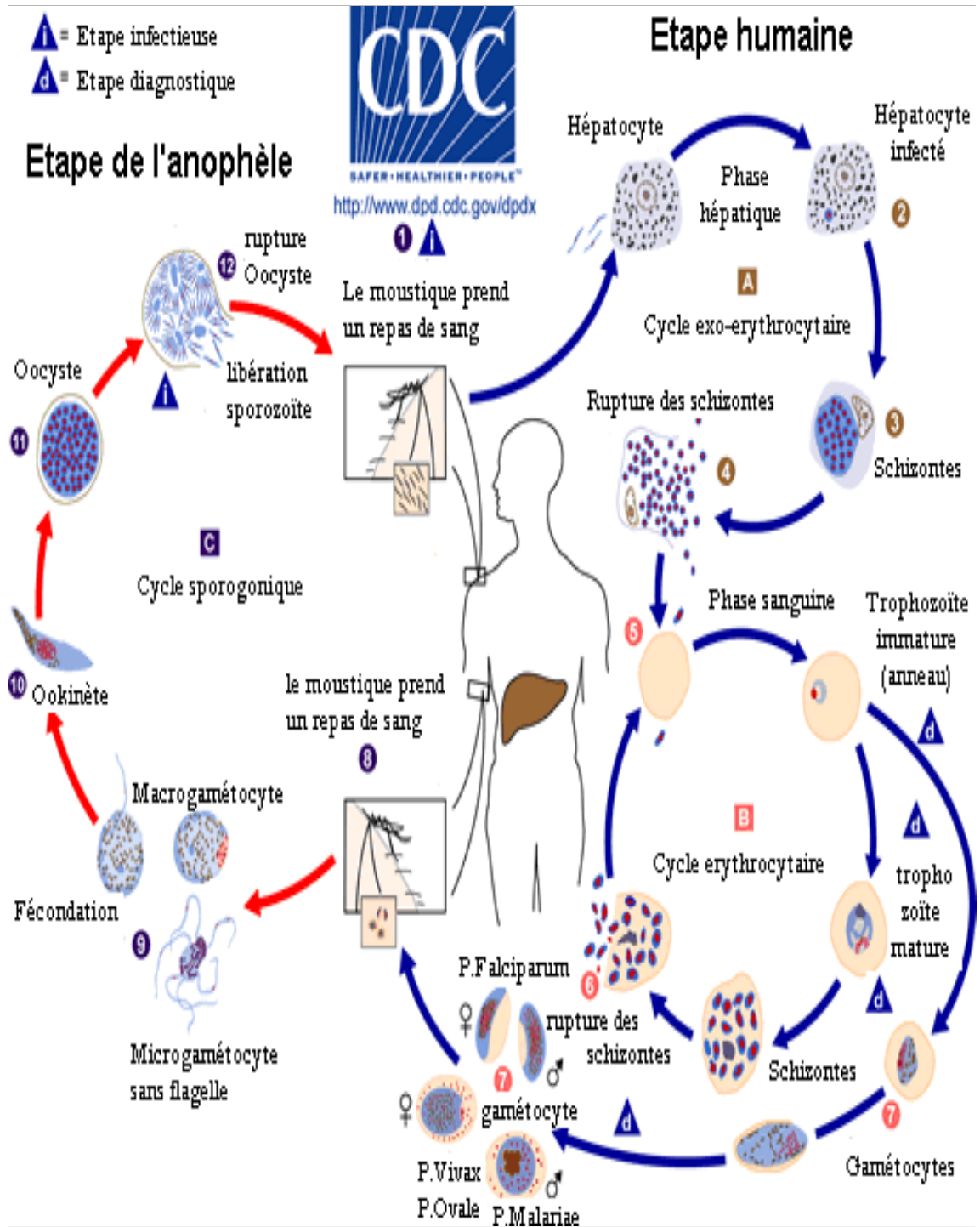
Il existe cinq espèces plasmodiales capables d'infecter l'homme. Les plasmodies font parties du règne des protistes, phylum des *Apicomplexa*, classe des *Haemosporidea*, sous-classe des *Coccidia*, ordre des *Haemosporida*, sous-ordre des *Haemosporiina*, famille des *Plasmodiidae*, au genre *Plasmodium*. Ce genre comprend deux sous-genres : le sous-genre *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) et le sous-genre *Laverania* (*P. falciparum*) enfin la cinquième espèce *P. knowlesi*, qui initialement décrit chez les primates récemment comme infectant l'homme (Singh, Kim Sung et coll. 2004).

- **Cycle biologique du parasite**

Au cours d'un repas de sang un moustique femelle infestant, injecte les sporozoïtes à l'homme (figure1), qui gagnent rapidement le foie : c'est la phase exo-érythrocytaire. Après une phase de multiplication, les parasites sont libérés dans la circulation sanguine et pénètrent dans les hématies, puis subit différentes transformations (mérozoïtes, trophozoïtes et schizontes), c'est la phase érythrocytaire ou endo-érythrocytaire ; qui est responsable des manifestations cliniques de la maladie.

Ces manifestations sont entre autre :

- accès fébriles et rythmés,
- une destruction massive d'hématies qui entraîne une anémie hémolytique,
- un sub-ictère,
- une détérioration de l'état général pouvant aboutir à la cachexie.



Source = CDC, Aslank, Goyù, VISA 1960 visité en Juin 2012.

Figure 1 Cycle de développement du plasmodium

3.2 Vecteurs du paludisme

3.2.1 Classification

Le vecteur du paludisme est un moustique. Il appartient au règne animal, à l'embranchement des arthropodes, à l'ordre des diptères, sous-ordre des nématocères, famille des culicidés, sous-famille des *Anophelinae*, genre *Anopheles*.

3.2.2 Biologie

Les anophèles femelles pondent leurs œufs à la surface de l'eau. Ces œufs, munis de flotteurs remplis d'air éclosent généralement 24 à 36 heures après la ponte (Holstein, 1949).

La larve subit trois mues consécutives qui par les modifications morphologiques qu'elles engendrent, la conduisent au stade nymphal. Le stade larvaire dure généralement de huit à douze jours à la température normale de l'eau et en milieu tropical selon les espèces (Rodhain et *al.*, 1985). La figure 2 représente le schéma du cycle biologique d'un *Anophelinae*.

La nymphe a l'aspect d'une virgule, au bout de 24 à 48 heures elle se transforme en moustique adulte ou imago qui émerge de l'eau.

Seules les femelles sont hématophages, les mâles se nourrissent de suc provenant des plantes.



Source: (J. Brunhes et al. , 1998)

Figure 2 Cycle biologique d'un *Anophelinae* (Brunhes et al, 1998)

Après la phase nymphale le moustique émerge et se repose sur son support, durant 10 à 24 heures, pendant que sa cuticule durcit, que ses ailes se déploient et que l'appareil génital mâle subit une hémirrotation de 180°, le rendant fonctionnel.

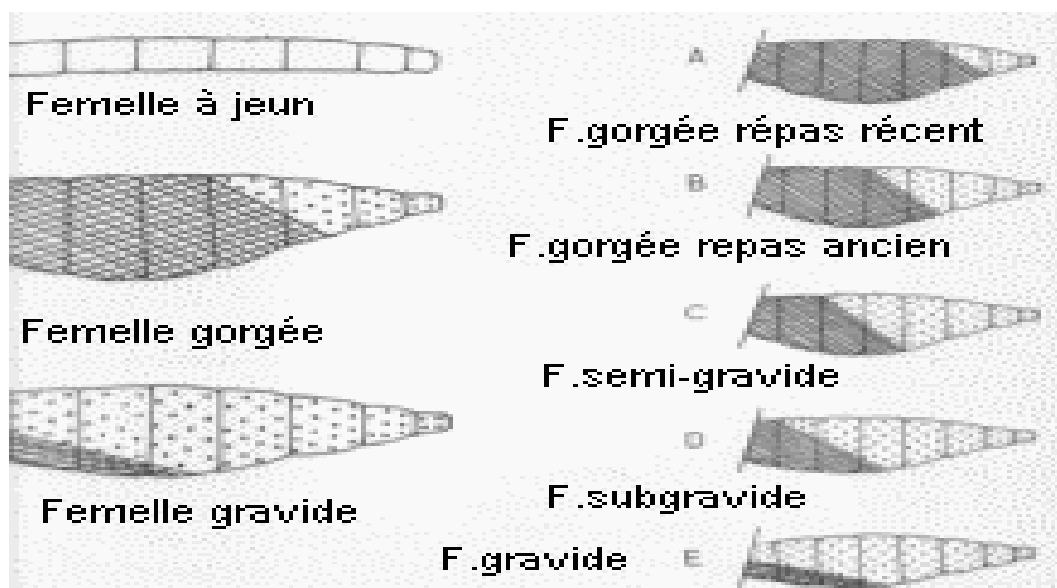
Les mâles et femelles s'accouplent, soit en vol pendant un essaimage (formé par les mâles), soit posé sur un support. Les mâles s'accouplent plusieurs fois dans leur vie mais les femelles ne s'accouplent le plus souvent qu'une seule fois (Clement, 1992). Les femelles inséminées conservent le sperme dans une poche, la spermathèque, d'où elles relarguent les spermatozoïdes lors des pontes successives (Page, et al 2007).

Le mâle ne se nourrit que de jus sucrés, fournisseurs d'éléments énergétiques. La femelle, outre l'absorption de jus sucrés, prélève du sang tous les deux à trois jours sur un hôte vertébré. Elle trouve dans ce repas sanguin les éléments protéiques nécessaires pour le

développement des ovocytes. Au cours du repas de sang, elle peut prélever jusqu'à quatre fois le volume de son abdomen. Après le repas de sang, la femelle se repose, le plus souvent près du sujet sur lequel elle s'est gorgée pour digérer le sang pendant 1 à 2 heures.

Pendant la digestion, les ovocytes grossissent jusqu'à occuper la plus grande partie de l'abdomen qui paraît blanc par transparence. Il est facile de déterminer à l'œil nu les stades d'évolution de l'abdomen pendant la digestion du sang. Ainsi suivant leur état de réplétion (Figure 3), les spécimens sont classés en :

- femelles à jeun ou non gorgée : femelles âgées ou non n'ayant pas encore pris du repas de sang après une ponte,
- femelles gorgées : femelles ayant pris fraîchement un repas de sang,
- femelles semi-gravides : abdomen à moitié noirâtre contenant du sang en digestion, avec la partie apicale blanche du fait du développement des ovaires,
- femelles gravides : femelles ayant développé des œufs conservés encore dans l'abdomen.



Source : [<http://.lozere.org/perso/malaria/vecteur.htm>] Juin 2012

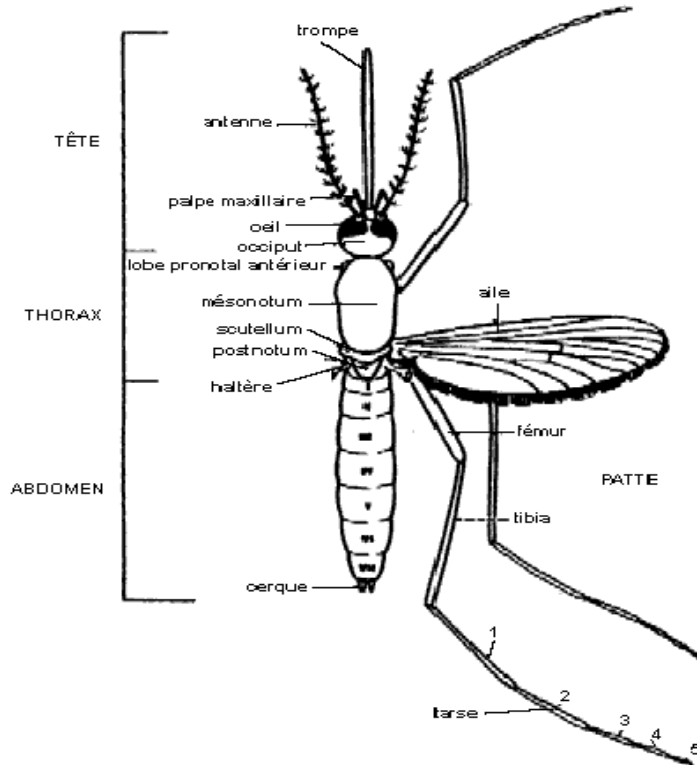
Figure 3 Les différents états de réplétion de l'abdomen des anophèles femelles après un repas de sang

Lorsque les œufs sont matures (gravide), l'anophèle part à la recherche d'eau stagnante (gîte) où elle dépose ses œufs. Après la ponte, l'anophèle part à la recherche d'un nouveau repas sanguin. Le cycle biologique débute par la piqûre d'un vertébré. Ensuite il se poursuit par la digestion du sang et la maturation des ovocytes. Enfin, la recherche d'un site d'oviposition et d'un nouvel hôte. L'ensemble de ces différentes étapes constitue le cycle gonotrophique (Clement, 1992).

Dans les régions tropicales et subtropicales, ce cycle dure 48 à 72 heures selon les espèces et en fonction de la température. Dans les zones tempérées et froides, il peut durer plus d'une semaine. La dispersion moyenne des anophèles adultes en vol varie de 10 à 14 km par nuit (Kaufman, et al 2004).

3.2.3 Morphologie

Le moustique adulte comprend trois parties bien distinctes : la tête, le thorax, et l'abdomen (Figure 4).



Source:[<http://www.ac-reunion.fr/hygieneetsecurite/chik/pdf/bio-mous.pdf>]. Juin 2012

Figure 4 Schémas descriptifs des Moustiques adultes

- **La tête** : comporte deux gros yeux, une paire d'antennes de quinze articles à soies nombreuses et longues chez le mâle, rares et courtes chez la femelle et la trompe ou proboscis qui représente les pièces buccales.
- **Le thorax** : est formé de trois segments (prothorax, mésothorax, métathorax) qui porte chacun une paire de pattes. Sur le second et le troisième segment, s'insèrent, respectivement une paire d'ailes et une paire d'haltères ou balanciers.
- **L'abdomen** : est formé de dix segments, dont sept sont bien visibles. Chaque segment est constitué d'une plaque chitineuse dorsale et d'une plaque ventrale reliée par une membrane. Les trois

derniers segments portent l'anus et l'appendices génitaux ou génitalias. L'ensemble trompe-tête-thorax-abdomen est dans le même alignement. Au repos, cet alignement détermine par rapport au support un angle aigu caractéristique des anophèles (Holstein, 1949).

3.2.4 Distribution géographique des membres des complexes *Anopheles funestus* et *gambiae* en Afrique

L'*Anopheles gambiae* et l'*An. funestus* sont les deux principaux vecteurs du paludisme au Mali (Touré et al 1979, 1998).

3.2.4.1 Systématique du groupe *Anopheles funestus*

Les espèces composant ce groupe sont mal connues et peu étudiées. Il comprend : *An. funestus sensu stricto*, *An. confusus*, *An. lesoni*, *An. rivulorum*, *An. rivulorum-like*, *An. brucei*, *An. parensis*, *An. aruni* et *An. vaneedeni*. Parmi la dizaine d'espèces décrites seul *An. funestus stricto sensu* est réellement vecteur du Plasmodium. Quant aux autres, elles ne sont généralement pas anthropophiles (Coetzee, et al 2004). Par contre *An. rivulorum* a été retrouvé porteur de Plasmodium en Tanzanie (Wilkes, et al 1996).

3.2.4.2 Systématique et distribution du complexe *Anopheles gambiae*

3.2.4.2.1 Systématique

De nos jours, le complexe regroupe sept espèces : *An. gambiae s.s* ; (Giles, 1902) et *An. arabiensis* (vecteurs majeurs de plasmodium), *An. melas*, *An. merus* ; *An. bwambae*, *An. quadriannulatus A*, et *An. quadriannulatus B* décrit récemment en Ethiopie (Hunt, et al 1998). *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus A*, et *An. quadriannulatus B* ont un rôle nul ou faible dans la transmission du paludisme.



Source : [en.wikipedia.org/wiki/file :anophelesgambiaemosquito.jpg]. Juin 2012.

Figure 5 *Anopheles gambiae* s.l. lors de la prise de repas de sang

3.2.4.2.2 Distribution géographique

La distribution du complexe *An. gambiae* est très localisée. *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont une aire de distribution plus vaste en Afrique. *An. gambiae* est rencontré dans la quasi-totalité de l'Afrique subsaharienne non méridionale (Mali, Guinée, Cameroun etc.). *An. gambiae* est plus adapté aux zones de forêt et de savane humides alors qu'*An. arabiensis* est rencontré dans des environnements plus secs jusqu'aux bordures du Sahara (Fontenille, et al 2003). Les deux espèces vivent parfois en sympatrie. Signalons que l'adaptation à des environnements différents d'*An. gambiae* s.s est due en grande partie à la présence d'inversions chromosomiques polymorphes observées au niveau du chromosome 2. Ainsi on a distingué cinq formes chromosomiques en Afrique de l'Ouest qui sont : les formes Forêt, Savane, Bamako, Bissau et Mopti (Touré, et al 1998 ; Coluzzi, et al 1979-2003). La forme forêt peuple le milieu forestier et de savane humide. Les formes Savane et Mopti se trouvent dans les environnements plus secs. Par contre Bamako est rencontré dans les zones de savane en bordure des cours d'eau. Devant les difficultés liées aux chromosomes polyténiques et l'impossibilité d'appliquer la cytogénétique de s'appliquer sur tous les stades de développement, une approche moléculaire de l'identification des formes chromosomiques a été développée (Favia, et al 2001). Elle consiste à

chercher des marqueurs moléculaires des formes chromosomiques basées sur les mutations fixées sur les fragments inter géniques de l'ADN ribosomal (ADNr).

Cette méthode a permis de différencier Mopti d'une part et Savane-Bamako d'autre part. Ces deux entités moléculaires ont été dénommées formes moléculaires M et S, respectivement (Snow, et *al* 2005 ; Fanello, et *al* 1996). Cependant M= Mopti et S= Savane-Bamako n'est pas valable dans tous les pays, mais il l'est au Mali, au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire.

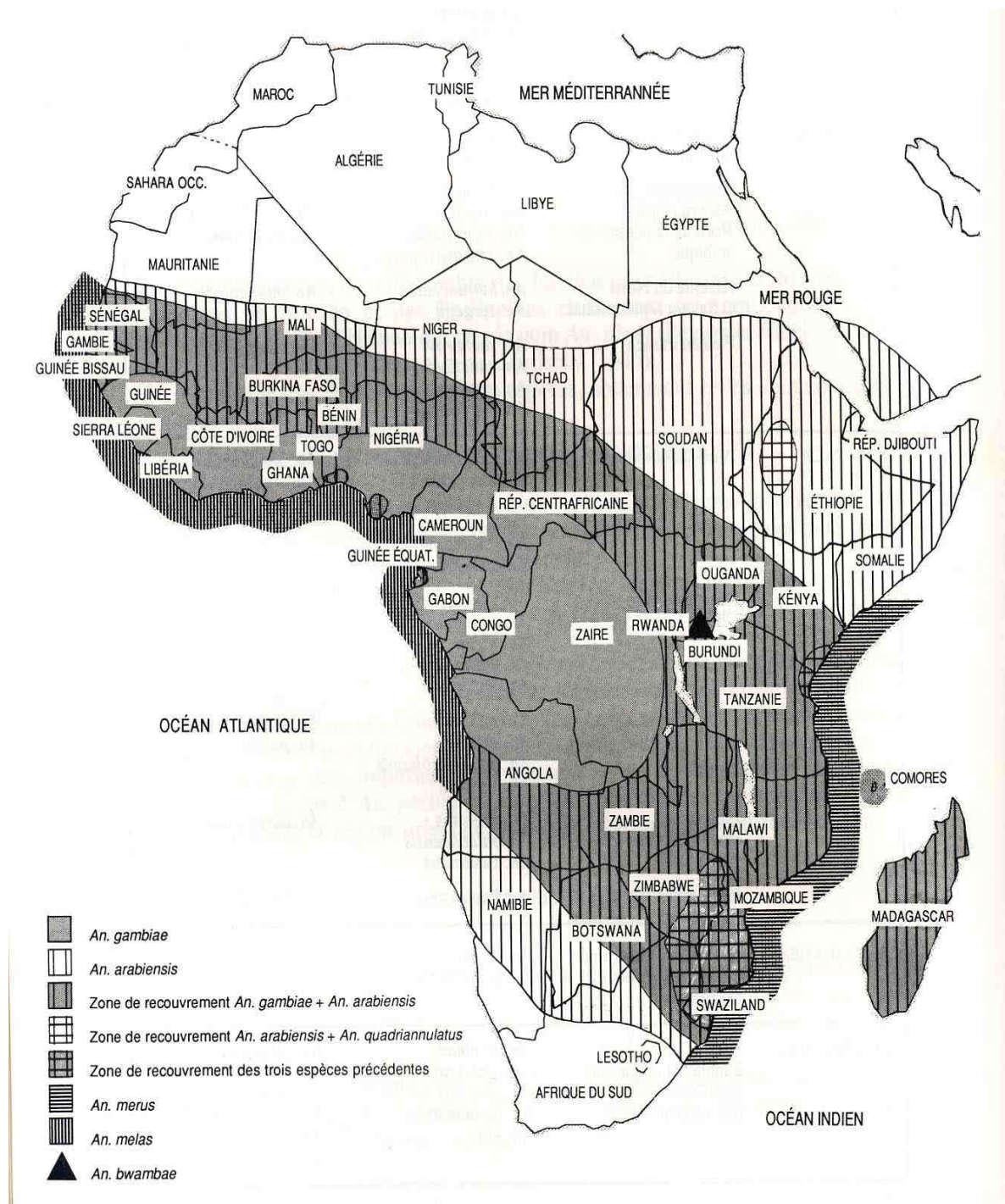


Figure 6 Répartition des espèces du complexe *Anopheles gambiae* en Afrique d'après Danis et Mouchet (1991), actualisé (Simard., 1999)

3.3 Lutte anti-vectorielle

On distingue deux principales méthodes : la lutte contre les moustiques adultes et la lutte les larves.

3.3.1 La Lutte contre l'anophèle au stade adulte

- Moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII)

Lorsqu'elles sont en bon état et que la taille de leurs mailles est adaptée, les moustiquaires offrent une bonne protection mécanique pour limiter le contact entre le vecteur et les hommes (Darriet, et *al* 2000).

Toutefois, lorsqu'elles ne sont pas bien imprégnées d'insecticide, elles ont une efficacité limitée dès qu'elles sont mal bordées, trouées ou plus fréquemment, lorsqu'une partie du corps touche le voilage permettant ainsi aux moustiques de piquer à travers les mailles.

Imprégner les moustiquaires avec un insecticide de la famille des pyréthrinoïdes permet de compenser certaines limitations. L'insecticide a plusieurs effets simultanés (Darriet, 1991). A son contact, il repousse les moustiques (effet excito-répulsif) les éloignant ainsi du dormeur. Cet effet répulsif peut se manifester à distance (effet dissuasif) : il est alors probablement dû aux micro-particules d'insecticides en suspension dans l'air. L'insecticide irrite aussi les moustiques, les empêchant de rester posés sur la moustiquaire à la recherche d'un orifice pour y pénétrer ou d'une partie du corps en contact avec le voilage. L'insecticide a une action de choc (Knock down en anglais) qui les tue ou les neutralise immédiatement avant même qu'ils n'aient pu piquer le dormeur.

Lorsque les moustiques sont restés suffisamment à son contact, l'insecticide peut enfin les tuer dans un délai plus ou moins long (effet insecticide).

Un contact avec des doses non mortelles d'insecticide contribue à raccourcir la durée de vie des adultes et, ainsi, à diminuer la transmission en diminuant la probabilité qu'un anophèle infecté par

des plasmodies devienne potentiellement infectant, avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

Quel que soit l'endroit choisi pour dormir (à l'intérieur ou l'extérieur d'une habitation), l'utilisation d'une MII protège son utilisateur. Le double effet insecticide et excito-répulsif, entraîne une diminution du nombre de moustique dans les chambres où elles sont installées. Lorsqu'une proportion importante d'une population humaine dort sous des moustiquaires imprégnées d'insecticide, les anophèles cherchant à les piquer sont fortement exposés à l'insecticide et, ont une durée de vie diminuée pour l'ensemble de la communauté humaine ; il s'agit de l'effet de masse (Curtis, et *al* 2003). La mise au point de moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée a permis de s'affranchir des contraintes de ré-imprégnation pour des programmes de lutte.

Ces moustiquaires sont recommandées par l'OMS (Anonyme. WHOPES).

- Pulvérisation intra domiciliaire d'insecticides à effet rémanent

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 traitées) et de la durée de rémanence souhaitée du produit, en particulier par rapport à la saison de

transmission (Figure 8). Elles ont été utilisées largement lors du programme mondiale 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. Actuellement, cette méthode connaît un regain d'intérêt (Anonyme. Indoor residual spraying 2006).

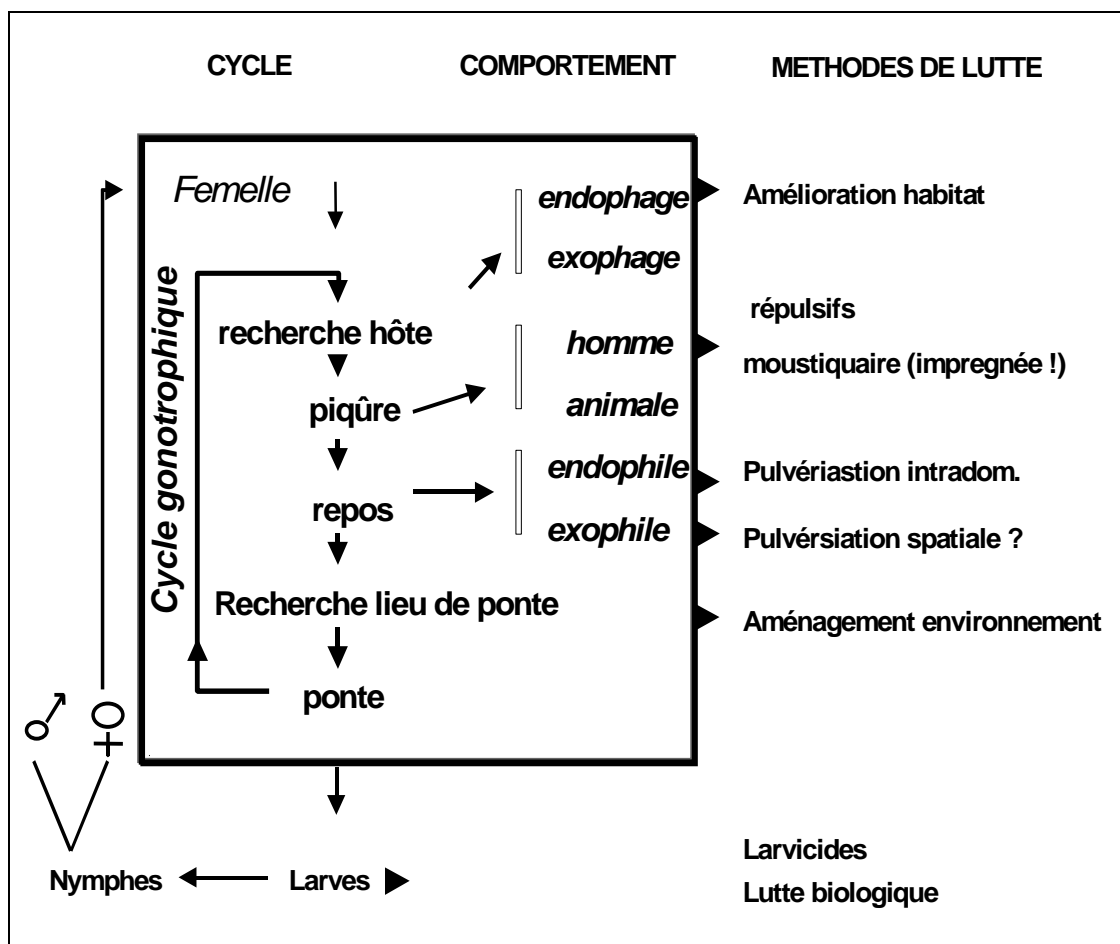


Figure 7 Cibles de la lutte anti vectorielle au cours du cycle gonotrophique (d'après Coosman et Carnevale, 1995)

3.3.2 La lutte contre l'anophèle au stade larvaire

Les moyens de lutte contre les larves permettent d'empêcher la prolifération des moustiques. La lutte contre les larves peut prendre plusieurs formes : 1) éliminer les lieux de ponte (drainage et assèchement des zones marécageuses), 2) les modifier pour que les larves ne puissent plus s'y développer (curage des canaux pour que l'eau n'y soit pas stagnante), 3) rendre les lieux de ponte inaccessibles aux moustiques adultes (protection ou couverture étanche des réserves d'eau domestique), 4) introduire dans les lieux de ponte des poissons larvivores ou d'autres prédateurs, 5) épandre des larvicides (insecticides préparations bactériennes) et des inhibiteurs de croissance des insectes (**IGRs** : insect growth regulators en anglais).

3.4 La résistance des vecteurs du paludisme en Afrique

3.4.1 Définition de la résistance

La résistance d'une population d'insectes donnée à un insecticide représente toute une augmentation, déterminée génétiquement, de sa tolérance à cet insecticide, en réponse à une pression de sélection.

(hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/14/24/47/PDF/T507Brevault.pdf).

3.4.2 Les différents types de résistance

La résistance chimique, la résistance métabolique, la résistance comportementale et la résistance physiologique.

- **La résistance chimique**
 - **La résistance aux pyréthrinoides et au DDT**

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides a été détectée très tôt en Afrique. Cela a commencé par l'apparition des anophèles résistants à la dieldrine au Nigéria en 1954 puis quelques années plus tard au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire (Adam, et al 1958 ; Hamon. et al 1963).

Par la suite, la résistance au DDT a été détectée à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) et a coïncidé avec l'utilisation massive du DDT dans les cultures cotonnières. Cette résistance a ensuite été détectée en Côte d'

Ivoire, au Nigéria, au Mali, au Sénégal, au Soudan, en Tanzanie, en Ethiopie et au Swaziland (Coz, et *al* 1968 ; Touré, 1982).

L'abandon du concept d'éradication des vecteurs du paludisme par le DDT, a conduit à un changement de stratégie et à l'adoption des pyréthriinoïdes en remplacement du DDT. Les stratégies utilisant les pyréthriinoïdes furent alors réorientées vers l'imprégnation des moustiquaires mais aussi la pulvérisation intra domiciliaire.

Le premier cas de résistance des anophèles aux pyréthriinoïdes fut détecté à Bouaké en Côte d'Ivoire dans les populations d'*An. gambiae* s.s. par Elissa (Elissa, et *al* 1993). La résistance a été également associée à l'utilisation intensive des pyréthriinoïdes dans la culture du coton à partir des années 70. La mutation *kdr* Leu-Phe a été mise en évidence comme principal mécanisme impliqué dans cette résistance. Avec la mise au point d'un tel diagnostic moléculaire des mutations (Martinez-Torres, et *al* 1998), la détection de cette résistance a été rendue facile et pratique. Plusieurs études en population naturelle d'*An. gambiae* ont rapporté que la mutation est présente en Afrique de l'ouest, du Sénégal au Nigéria (Akogbeto, et *al* 1999 ; Yawson, et *al* 2004). Les deux mutations *kdr-w* et *kdr-e* sont maintenant décrites tant chez *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* en Afrique de l'Est mais aussi en Afrique Centrale et en Afrique de l'Ouest (Verhaeghen, et *al* 2006 ; Diabaté, et *al* 2004).

- **Mise en évidence du gène Kdr**

- Confère une résistance croisée aux pyréthriinoïdes-DDT
- Mutation du canal Na entraînant une diminution de l'affinité des insecticides pour le canal
- Mutation mise en évidence chez *Musca domestica*, *Blatella germanica* et plusieurs ravages agricoles
- Mutation présente également chez *An. gambiae* s. s en Afrique de l'ouest.

- **La résistance aux carbamates et aux organophosphorés**

Le premier cas de résistance aux organophosphorés des vecteurs du paludisme en Afrique a été rapporté en 1983 chez *An. arabiensis* vis-à-vis du malathion et du penthoate au Soudan (Hemingway, 1983). Des baisses de sensibilité au propoxur et/ou au bendiocarbe (carbamate) ont été signalées chez *An. funestus* en Afrique du Sud (Brooke, et al 2001). Des baisses de sensibilité au propoxur et/ou au bendiocarbe (carbamate) ont été récemment notées chez des populations d'*An. arabiensis* et d'*An. funestus* au sud du Mozambique (Casimiro, et al 2006-2007). En Afrique de l'Ouest, notamment en Côte d'Ivoire, une résistance au propoxur avait été notée chez *An. gambiae* s. s. à Bouaké dès 1994 (Elissa, et al 1994). Une décennie plus tard, une résistance au carbosulfan (carbamate) a été détectée dans des villages de Bouaké en Côte d'Ivoire (N'Guessan, et al 2003).

La mise au point d'un outil moléculaire pour le diagnostic de la mutation G119S (mutation *acer-1^R*), principal mécanisme impliqué dans la résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés (Weill, et al 2004), a facilité sa mise en évidence dans les populations naturelles d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Ouest. Des travaux très récents ont montré la résistance de cette mutation G119S au Burkina Faso, au Bénin et au Togo (Djogbénou, et al 2008).

- **Résistance métabolique**

D'autres mécanismes de résistance aux pyréthrinoides notamment impliquant les oxydases ont aussi été décrits dans la baisse de sensibilité des populations d'*An. gambiae* s.s. au Kenya (Vulule, et al 1999) ainsi que des populations d'*An. arabiensis* au Nord Cameroun (Chouaïbou, et al 2008 ; Etang, et al 2007). Ces mécanismes sont aussi à la base de la résistance d'*An. funestus* aux pyréthrinoides en Afrique du Sud et au Sud du Mozambique (Amenya, et al 2005 ; Hargreaves, et al 2000).

- **Résistance comportementale**

La résistance comportementale repose sur une modification du comportement de l'insecte lui permettant d'éviter un contact avec

la molécule d'insecticide. La résistance comportementale est moins bien connue que les autres mécanismes de résistance.

- **Résistance physiologique**

Elles résultent de l'apparition de mutations, à une très basse fréquence, dans des populations d'insecticides. 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;
- des mutations du site d'action des insecticides (récepteurs gamma-amino-butyrac acid GABA) pour la deltaméthrine ;
- l'altération du canal sodium (gène kdr -knock-down résistance) pour le DDT et les pyréthrinoides;
- la modification des acétylcholinestérases pour les organophosphorés et les carbamates.

4. MATERIEL ET METHODES

4.1 Sites d'étude

L'étude s'est déroulée dans trois villages du cercle de Barouéli : Boidie, Kamba et Soungola tous dans la commune rurale de Boidie. Barouéli est situé à environ 180 km au Nord-est de Bamako dans la zone de savane nord soudanienne en 4^{ème} région administrative du Mali (Ségou), voire tableau 1. La (Figure 8) représente la carte du site d'étude.

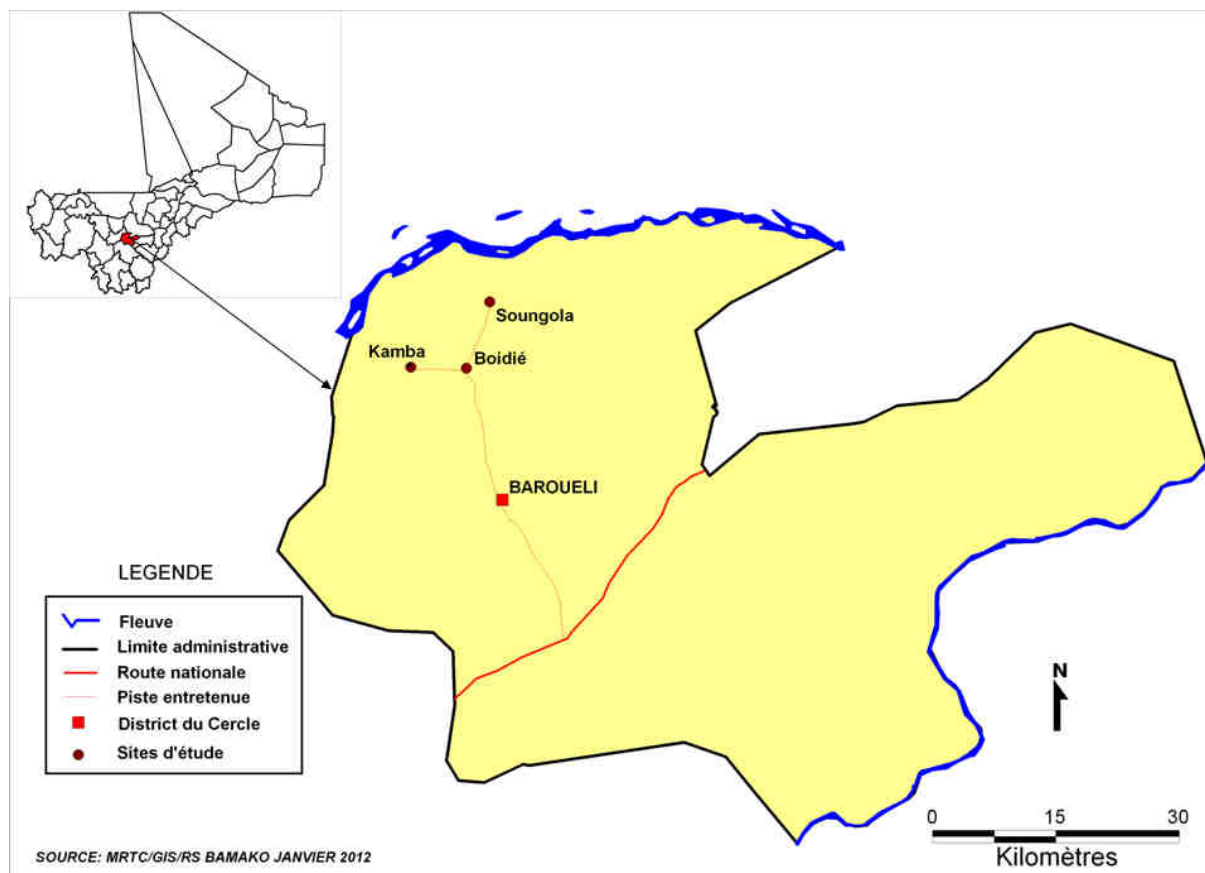


Figure 8 Carte du site d'étude, (Source MRTG)

4.1.1 Historique

Le cercle de Barouéli issu de l'ancien cercle de Ségou se situe à la porte de la 4^{ème} région administrative du Mali. Son histoire se confond avec celle du royaume Bambara de Ségou : N'Golo DIARRA l'un des successeurs du Roi Bambara Biton COULIBALY (contemporain de LOUIS XIV) est originaire de Niola, village situé dans l'actuelle commune rurale de Konobougou. A Dioforongo village situé dans l'actuelle commune de Sanando résident les descendants de Bakary Djan l'un des braves soldats de Dah (petit - fils de N'Golo DIARRA).

En effet, les premiers occupants du terroir qui portent aujourd'hui le nom du cercle de Barouéli étaient les Bambaras, vassaux du Royaume Bambara de Ségou, sont arrivés ensuite de l'actuel cercle de Banamba harcelés par les Bambaras Massassi du Karta, les Soninkés en plusieurs clans (SYLLA, SACKO, TOUNKARA), suivirent les Toucouleurs (TALL, LY, N'DIAYE et AW) et les Peulhs (DICKO, BILL, DIALLO, BAH) tous venus du Fouta Toro avec les troupes d'El Hadj Oumar. Son nom original BARA KA WERE (le hameau de la femme aimée).

L'ancienne subdivision de Barouéli de la période coloniale a été transformée en arrondissement avant l'avènement de l'indépendance et après érigée en cercle à la faveur de l'Ordonnance N°7744 / CMLN du 12 juillet 1977 et fonctionnel depuis le 27 septembre 1978.

4.1.2 Données géographiques et le relief

Le cercle de Barouéli, couvre la partie Ouest de la région de Ségou. Sa superficie est de 4710km². Il est limité :

- Au nord par le fleuve Niger.
- A l'est par le cercle de Ségou.
- Au sud par le Bani (affluent du Niger)
- A l'ouest par les cercles de Dioïla et de Koulikoro.

Son relief, formé de plateaux moyens et plaines est couvert d'une végétation de savane herbacée parsemée de balanzans et de karités avec deux forêts classées une située à Koulala dans la commune rurale de Barouéli et l'autre à Dioforongo dans la commune de Sanando.

Le climat est de type soudano- sahélien, caractérisé par l'alternance de deux saisons :

- Une saison sèche répartie entre une période froide de novembre à février et une période chaude allant de mars à mai
- Une saison pluvieuse de juin à septembre.

On y rencontre deux types de vents :

- L'harmattan qui souffle pendant la saison sèche ;
- La mousson pendant la saison des pluies.

Le fleuve Niger et son affluent le Bani constituent l'essentiel du réseau hydrographique permanent du cercle. Toutefois, on y rencontre de nombreux marigots et mares temporaires.

En période de crue, le fleuve Niger sur 50 Km et son affluent le Bani sur 65 Km sont navigables

Sa pluviométrie moyenne annuelle est de 600 à 800 mm³.

4.1.3 Données démographiques

La population du cercle de Barouéli est estimée à 218469 habitants en 2011. Elle est composée de 50,50% femmes et de 49,50% hommes (Sources : SLSIAP Barouéli, RGPH 2009). La densité moyenne est de 45,31 habitants au Km² avec un taux d'accroissement de 2,4 %.

Les ethnies dominantes sont : les Bambara, les Sarakolé, les Peulh, les Somono et les Bozo. Quant aux langues vernaculaires couramment parlées, le bamanankan, le soninké et le fulfulde sont les plus utilisées. L'islam est la religion dominante des populations du Cercle. Barouéli est une zone de renommée en matière d'islam avec ses multiples maîtres coraniques, marabouts et mosquées. L'islam, principale religion cohabite pacifiquement avec le christianisme et l'animisme.

Tableau 1 Coordonnées géographiques et populations des sites d'étude à Barouéli (RGPH 2010)

Districts	Villages	Cordonnées géographiques		Population
		Longitude	Latitude	
Barouéli	Boidie	-6.871279	13.215680	4415 habitants
	Kamba	-6.933333	13.216666	2208 habitants
	Soungola	-6.844940	13.287580	1925 habitants

4.2 Période et type d'étude.

L'étude s'est déroulée de juin à octobre 2010. Elle était de type transversal à passages répétés.

4.3 Techniques de collecte et de traitement des moustiques

- Capture par aspersion d'insecticides

Les moustiques de la faune résiduelle ont été collectés par spray catch.

Le spray catch a consisté à l'aspersion de bombe d'insecticide dans les habitations humaines et aux collectes d'insectes sur les draps étalé au préalable.

Le spray catch a été mensuellement effectué dans 30 pièces par village, entre 14 h et 16 h.

Ensuite l'identification morphologique des espèces de moustique : *An. gambiae* s.l une fois identifié était mis dans un tube Eppendorf 0.5 ou 1.5 contenant de l'alcool 80% pour sa conservation.

Ensuite c'est la dissection des moustiques qui consiste à séparer le thorax du reste de l'abdomen soit sur le terrain soit au laboratoire.

La partie tête/thorax était utilisé à l'ELISA (CSP)/PCR pour l'identification de l'IAS des espèces et formes moléculaire.

L'abdomen était utilisé par ELISA (Blood meal) pour l'identification de repas de sang (Figure 9).

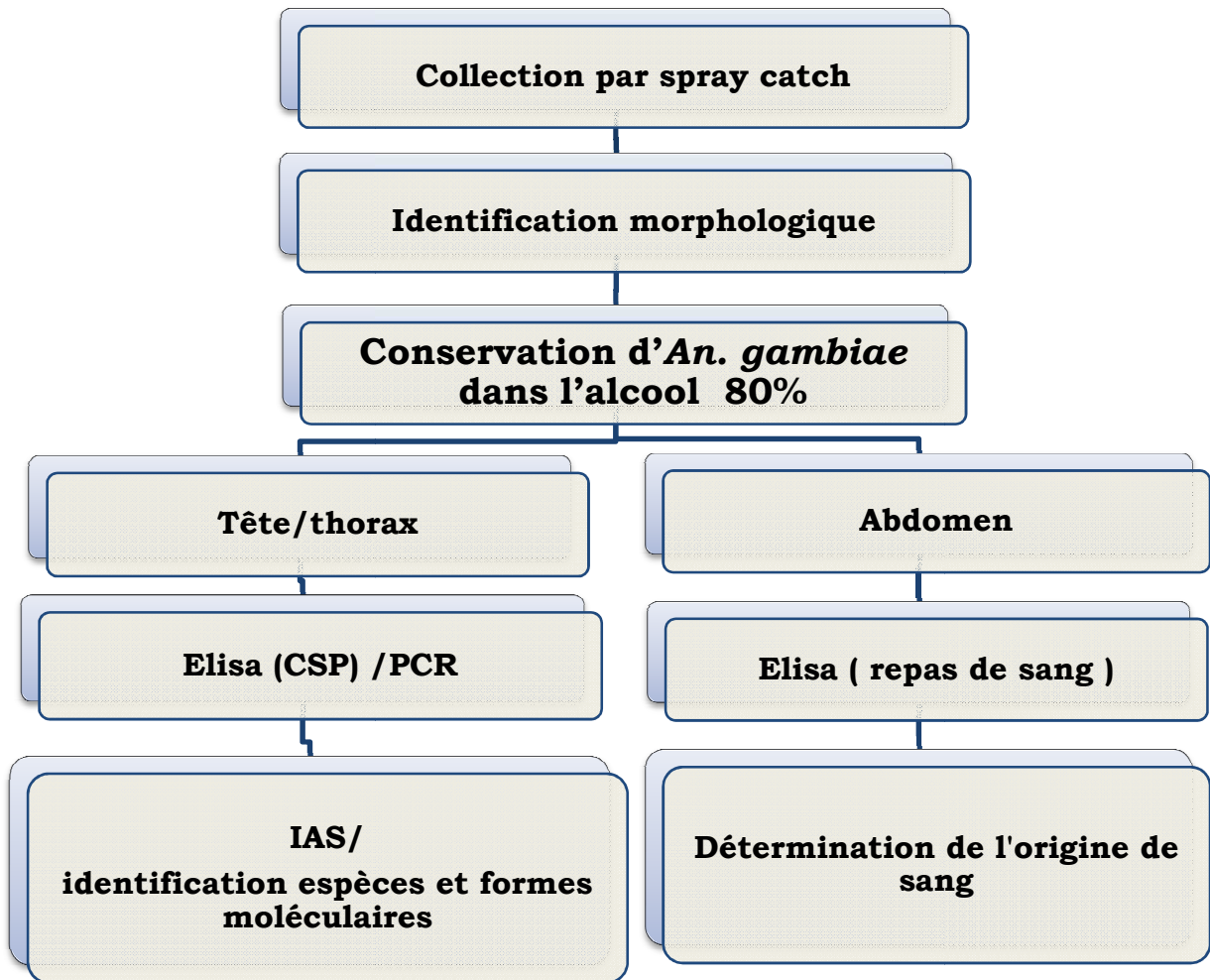


Figure 9 Diagramme de traitement des échantillons du spray-catch

- Captures nocturnes sur appâts humains (CN)

Les séances de capture étaient mensuelles avec deux séances et deux postes par village.

Elles ont été effectuées entre 18H-6H du matin, à l'intérieur et l'extérieur des chambres par des hommes adultes volontaires.

Elles ont consistées à l'aspiration de moustiques à l'aide d'un aspirateur à bouche de type Coluzzi.

La dissection concernait seulement l'*An. gambiae s.l*, par l'extraction d'ovaires sous loupe et sa visualisation sous microscope électronique dans le but de déterminer la parturité du moustique (Figure 10).

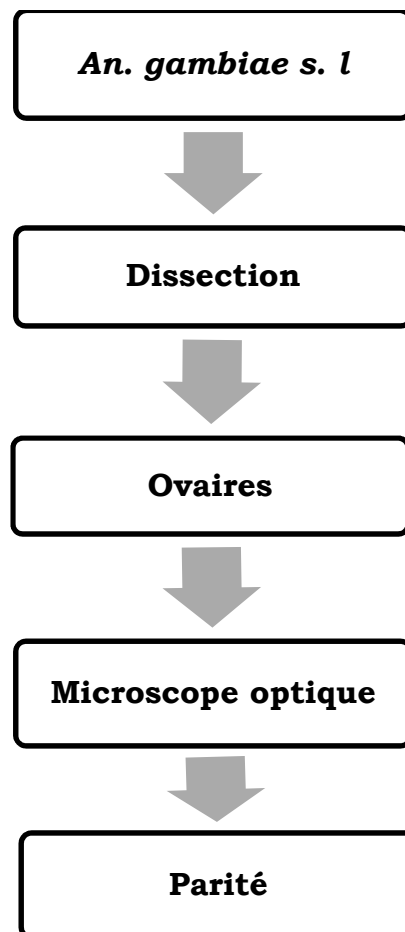


Figure 10 Diagramme de traitement des échantillons de la CN

- Aspects d'ovaires des moustiques disséqués

La figure 11 représente les aspects des ovaires des moustiques disséqués. Les moustiques dont les trachéoles (filaments) ovariens sont enroulés sont dits nullipares tandis que sont dits pares, ceux dont les trachéoles sont déroulés.

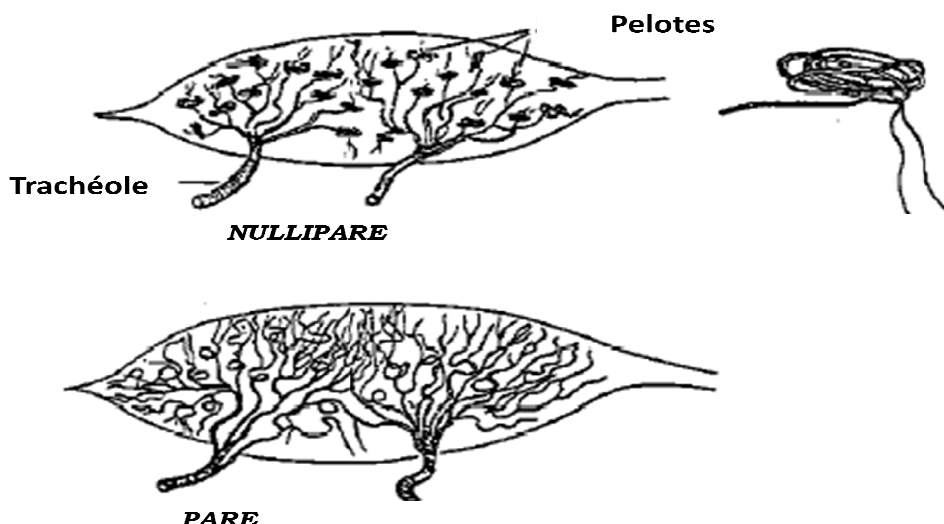


Figure 11 Aspect d'ovaire des moustiques disséqués

➤ **Protocoles de collecte**

L'échantillonnage des populations de *Culicidae* a porté uniquement sur les imagos. Il a été fait par les techniques de capture nocturne sur appât humain (hommes adultes volontaires) et de capture de jour de la faune résiduelle matinale par pulvérisation des habitations (cases/chambres à coucher) à l'aide de bombe insecticide à base de pyréthrinoides.

Dans chaque village sélectionné, quatre hommes adultes volontaires par nuit de capture divisés en deux groupes et répartis en deux tranches horaires (18 h-00 h et 00 h-06 h) dont un captureur à l'intérieur et à l'extérieur des chambres à coucher.

Sur le terrain, les femelles de *Culicidae* récoltées ont été identifiées par genre et les densités des femelles agressives et endophiles ont été déterminées pour les *Anophelinae*. Les femelles d'*Anophelinae* ont été ensuite identifiées par espèce.

Les femelles d'*An. gambiae s.l.* collectées dans l'après midi au repos à l'intérieur des habitations humaines ont été classées selon leur état physiologique en femelles à jeun, gorgées, semi gravides et gravides. La détermination du taux de parturité à partir des moustiques du CN a été faite par la méthode de Detinova (Detinova 1964 ref) sous une loupe binoculaire.

Les femelles d'*An. gambiae s.l.* (disséquées ou non disséquées) ont été individuellement placées dans des micro-tubes contenant de l'éthanol concentré à 80 % et portant le numéro correspondant à celui du moustique sur la fiche de terrain.

Au laboratoire, les échantillons de moustiques collectés étaient conservés à -20°C ou -80°C, l'identification des espèces et formes moléculaires des membres du complexe *An. gambiae s.l.* a été faite par la technique de biologie moléculaire (PCR). La détermination de leur taux d'infection spécifique ainsi que celle de l'origine de leurs repas de sang a été faite par méthode immunoenzymatique.

4.4 Recherche d'infection plasmodiale

La détection des femelles infectées a été faite par ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) indirect qui consiste à détecter la protéine circumsporozoïtique (CSP) des sporozoïtes de *Plasmodium* contenus dans la portion tête-thorax des moustiques grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques. La (CSP) est la protéine majeure exprimée sur la surface des sporozoïtes de *Plasmodium*. La technique de détection utilisée est celle de « l'ELISA sandwich » décrite par (Burkot et al. 1984) modifiée par (Wirtz et al. 1987). Le principe étant de prendre la protéine circumsporozoïtique (CSP) en sandwich entre un anticorps monoclonal de capture anti-CSP (Anti-CSP cap) fixé sur les parois des puits et un anticorps monoclonal anti-CSP (Anti-CSP)

conjugué à la peroxydase. L'ajout du substrat de peroxydase permettra de révéler la présence du complexe Anti-CSP cap.-CSP-Anti-CSP (Figure 12).

Il n'a été procédé qu'à la détection de *Plasmodium falciparum*, en raison du fait qu'il constitue l'agent causal prédominant du paludisme au Mali.

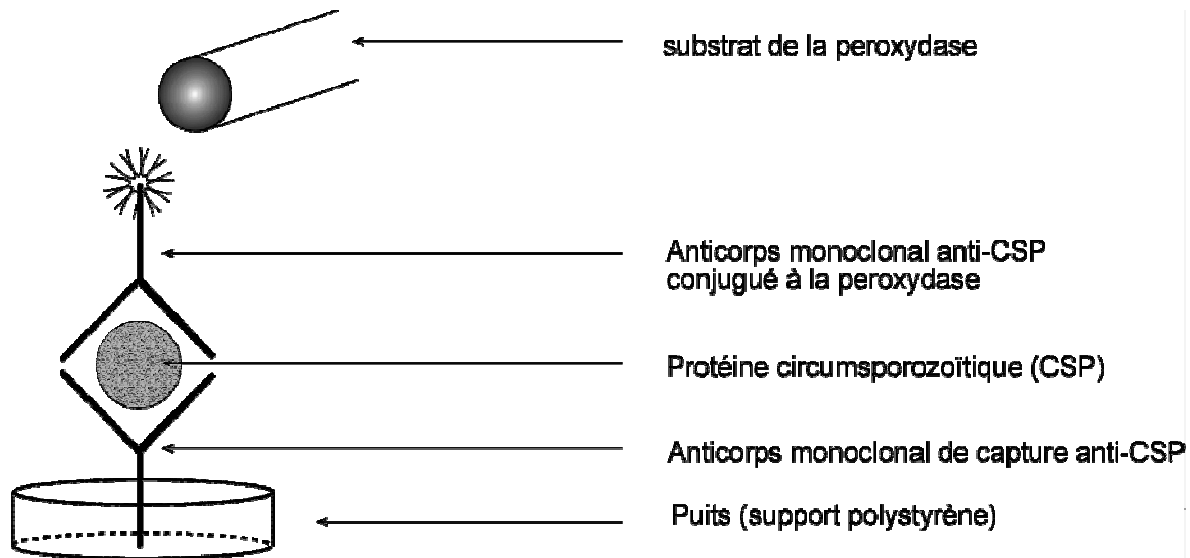


Figure 12 Schéma du principe de l'ELISA circumsporozoïtique (méthode du sandwich)

4.5 Détermination de l'origine des repas de sang

La détermination de l'origine des repas sanguins est basée sur des caractères sérologiques du plasma (recherche d'immunoglobulines G ou IgG). Elle consiste à faire agir des anticorps spécifiques d'hôtes potentiels (homme, bœuf, mouton, poule, cheval etc) sur le sang absorbé par les moustiques. Ces anticorps sont marqués par une enzyme (peroxydase). En présence du substrat de cette dernière, une réaction colorée révèle la présence de l'IgG à identifier. La technique utilisée est celle de l'ELISA directe de (Beier *et al.* 1988) légèrement modifiée (Figure 13).

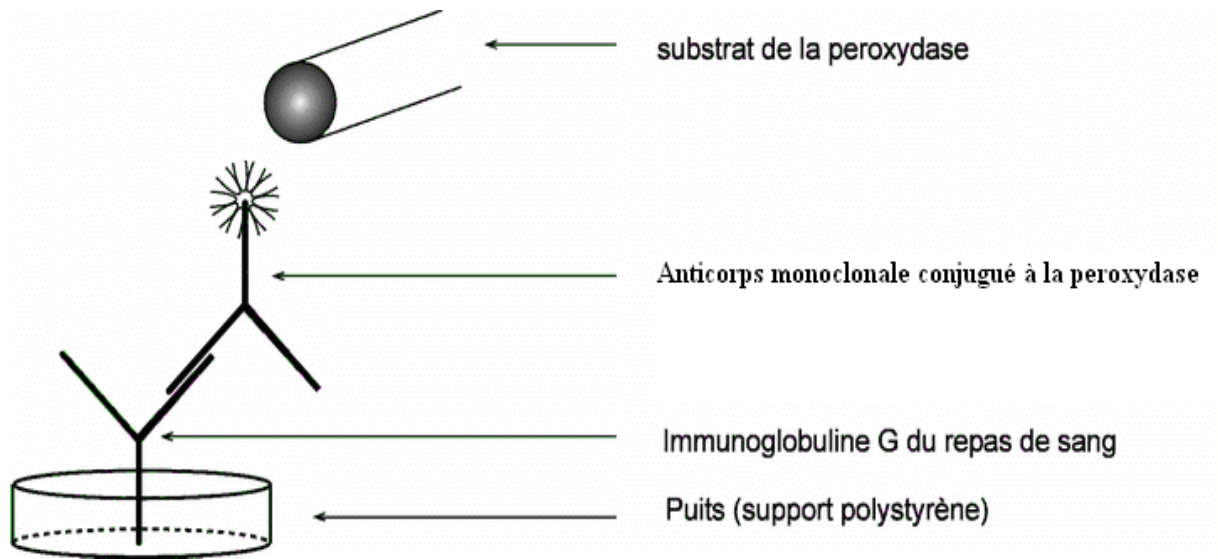


Figure 13 Schéma du principe de l'ELISA repas de sang (méthode directe) (Ref ??)

4.6 Test d'insecticides

4.6.1 Matériel

- Tube en plastique (125mm/44mm)
- Ecrans de maille
- Plaques coulissantes
- Feuilles de papier propre (12cm/15cm)
- Pincettes à ressort (bracelets)
- Eprouvettes d'aspiration en verre
- Rouleau de bande plastique autoadhésive.

4.6.2 Moustiques utilisés pour le test d'insecticide

Les tests sont réalisés avec les membres du complexe *Anopheles gambiae s.l* principales espèces vectrices au Mali. Les moustiques femelles utilisés étaient la première génération (F1) issue des femelles sauvages capturées sur le terrain, avaient un état de réplétion à jeun.

Environ 125 moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours ont été prélevés de la cage avec un aspirateur de transfert et transférés dans les tubes d'attente (25 femelles par tube). Toute autre méthode de prélèvement et de transfert

des moustiques n'entraînant pas une mortalité excessive des spécimens peut être utilisée.

4.6.3 Température et humidité relative pendant le test

Les tests se sont déroulés à la température de 25°C à 32°C et entre 70-80% d'Humidité Relative (HR). Après exposition, les moustiques femelles recevaient une solution à 5% de sucre et étaient conservés pendant 24 heures dans l'obscurité dans des conditions ambiantes de température et d'humidité. Au total, 25 moustiques étaient utilisés par éprouvette. Les moustiques étaient retirés de leur cage à l'aide d'un aspirateur à bouche fourni avec le kit.

4.6.4 Insecticides utilisés pour le test :

Les cinq insecticides utilisés pour le test ont été : la deltaméthrine (0,05%), la lambda-cyhalothrine (0,05%) le bendiocarbe (0,1%) la perméthrine (0,75%) et le DDT (4%).

4.6.5 Procédure du test

- Les moustiques femelles étaient retirés et transférés doucement dans l'éprouvette d'attente (avec un point vert).
- Au moins une heure de repos était observée avant le test afin d'éliminer les spécimens traumatisés à la fin de la période d'attente.
- Une feuille de papier imprégnée d'insecticide enroulée en cylindre était introduite dans l'éprouvette d'exposition (avec un point rouge), pour bien tapisser la paroi, nous l'avons maintenue en place avec une pince (en cuivre pour l'éprouvette qui contient le papier imprégné et en acier pour celle contenant le papier de contrôle). Pour les témoins, nous avons utilisé une feuille de papier blanc non imprégnée d'insecticide.
- L'éprouvette d'exposition était insérée dans le bout à vis de la plaque. Puis était aligné l'ouverture de la plaque avec celle de l'éprouvette d'exposition et de l'éprouvette d'attente afin de faire passer les moustiques dans l'éprouvette d'exposition. Les moustiques étaient ensuite doucement soufflés de l'éprouvette d'attente vers l'éprouvette

- d'exposition et enfin repoussé le levier de la plaque pour la refermer. Pour finir, l'éprouvette d'attente était détachée pour la déposer de côté.
- A la fin de l'heure d'exposition (1heure), les moustiques étaient transférés dans l'éprouvette d'attente en inversant la procédure précédente.
 - Le décompte de la mortalité était effectué après 24 heures. Les spécimens affectés, incapables de se mouvoir étaient considérés comme morts. Les résultats ont été enregistrés sur les formulaires fournis par l'OMS (annexe).
 - Après 24 heures, les moustiques morts ont été individuellement conservés dans l'éthanol à 80%, au frais, séparément de ceux qui ont survécu, mais n'ont pas été traités au laboratoire. Ils ont été conservés pour des travaux ultérieurs (Figure 14).



Figure 14 Technique d'exposition des moustiques aux insecticides (phase de transfère)

4.7 Identification moléculaire des moustiques

Les moustiques identifiés sont issus des captures par spray-catch. L'identification a concerné seulement le complexe *An. gambiae s.l.* L'extraction d'ADN a été faite selon le protocole de Collins et al., 1987. L'identification des espèces et des formes moléculaires a été faite par la PCR (polymerase chain reaction) selon la méthode de Fanello et al. 2002.

4.8 Paramètres entomologiques mesurés

a) Fréquence des espèces vectrices

Elle exprime la composition des espèces rencontrées. Elle est égale au nombre total de l'espèce donnée (n) divisé par le nombre total (N) de moustiques capturés.

b) Densité anophelienne

La densité anophelienne s'obtient en faisant le rapport de la fréquence des espèces vectrices par le nombre total de chambres prospectés.

c) Agressivité (ma)

Ce paramètre correspond au nombre moyen de piqûres d'une espèce donnée, reçues par homme durant une période donnée (nuit, mois,...).

L'agressivité se calcule de deux manières:

i. En capture de jour (Spray-catch):

C'est le nombre total d'anophèles femelles d'une espèce donnée gorgée et semi-gravides capturées dans une chambre, divisé par le nombre de personnes ayant dormi dans la chambre la veille.

ii. En capture de nuit:

L'agressivité est égale au nombre total d'anophèles d'une espèce donnée capturée divisé par le nombre de captureurs.

d) Taux de parturité

C'est la proportion de femelles pares sur l'ensemble des femelles disséquées (pares + nullipares). Ce paramètre est déterminé à partir des femelles à jeun des captures nocturnes en utilisant la méthode de Detinova.

e) Taux d'infection (IAS)

Il correspond au pourcentage d'anophèles d'une espèce donnée ayant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires: indice sporozoïtique (**IS**) ou d'antigène circumsporozoïtique (IAS) par rapport au total des moustiques examinés à l'ELISA.

f) Les habitudes trophiques

Les habitudes trophiques font référence au fait que les vecteurs préfèrent se nourrir à l'intérieur (endophagie) ou à l'extérieur (exophagie) et de préférence pendant la nuit (cycle de piqûre nocturne).

L'endophagie et l'exophagie sont estimées par des captures sur appâts humains à l'intérieur et à l'extérieur des chambres.

g) Taux d'anthropophilie (T.a)

Le Taux d'anthropophilie est la proportion de femelles d'une espèce d'Anophèle ayant pris leur repas de sang sur Homme. Ce paramètre est égal au nombre de moustiques avec sang d'origine humaine multiplier par cent divisé par le total examiné.

$T.a = (\text{Nombre de sang d'origine humaine} / \text{Total examiné}) * 100$

h) Temps de Knockdown (Kdt)

Pour cela, on utilise très généralement deux temps : le Kdt50 et le Kdt90 qui signifient respectivement le temps au bout duquel 50% et 90% des moustiques tombent au cours d'un test d'insecticide.

i) Taux d'inoculation entomologique (h)

Il représente le nombre de piqûres infectantes reçues par Homme et par unité de temps (nuit, mois, ou année). **h** = **ma.IAS** (formule de Mac-Donald); où **ma** est l'agressivité et **IAS** l'indice antigène sporozoïtique. Il

est estimé espèce par espèce. La transmission globale est égale à la somme des (h) des différentes espèces vectrices.

4.9 Analyses et interprétations des résultats

Les données ont été saisies et analysées en utilisant le logiciel Epi info 3.5.3 et Epi 6. Le logiciel Excel 2007 a été utilisé pour les représentations graphiques.

Les tests statistiques utilisés ont été :

-Le khi-carré (χ^2) de Pearson pour la comparaison des taux et proportions ; le test ANOVA pour la comparaison des moyennes ; le risque alpha a été fixé à 5 % (0,05).

4.10 Considérations éthiques

Le protocole a été soumis et approuvé par le Comité d'éthique de la FMPOS avant le début des travaux.

5. RESULTATS

5.1 Composition de la faune résiduelle dans les sites d'étude

L'*Anopheles gambiae s.l* a été l'espèce la plus prédominante durant la période d'étude (65%, N=11583).

Trois autres espèces, *Culex sp*, *Aedes sp* et *An. rufipes* non incriminé dans la transmission du paludisme humain ont été retrouvées. Parmi ces trois, *Culex sp* a été l'espèce la plus prédominante (18%) suivit d'*An. rufipes* (16%) (Figure 15).

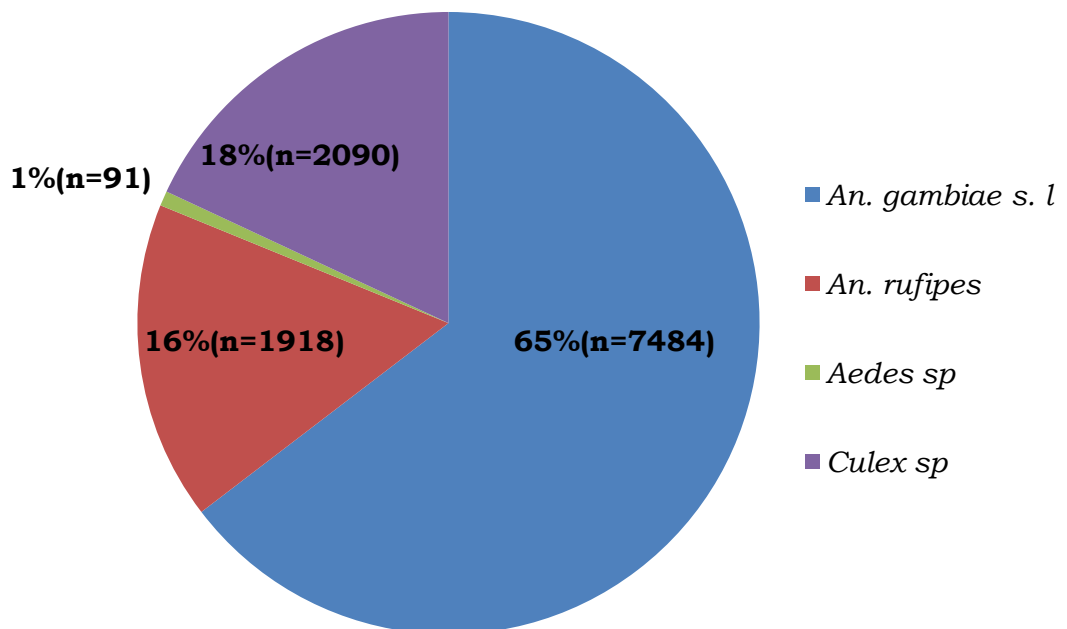


Figure 15 Composition de la faune résiduelle à partir du spray catch dans les sites d'étude

5.1.1 Fréquence d'*Anopheles gambiae s. l* par mois et par village

Les fréquences les plus faibles d'*An. gambiae s. l* ont été obtenues au mois de juin tandis que les plus élevées ont été obtenus aux mois d'août et de septembre (Figure 16).

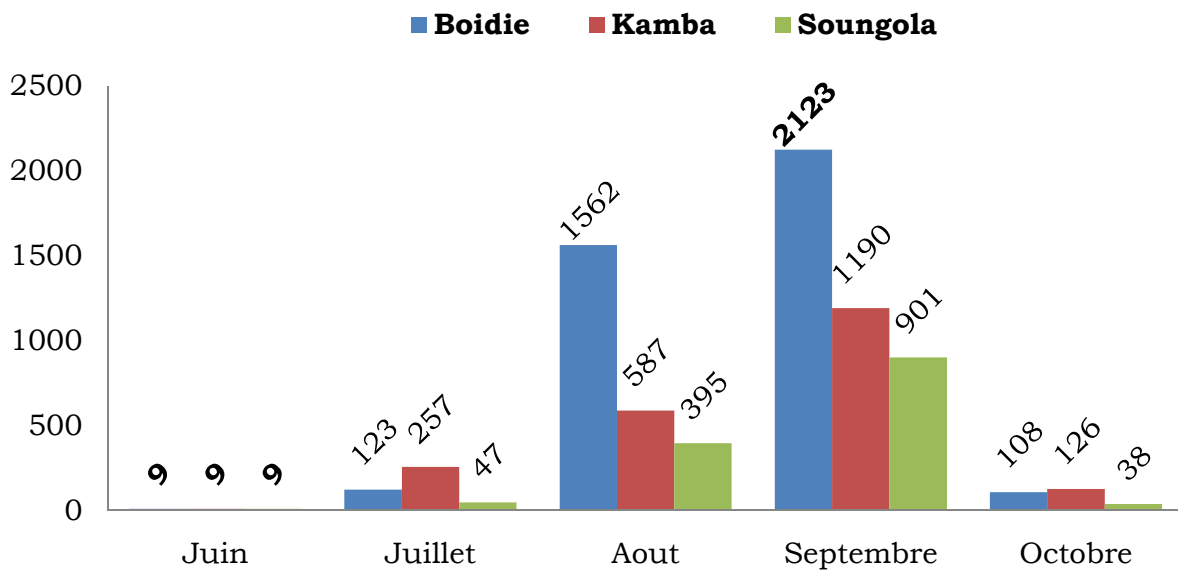


Figure 16 Fréquence d'*An. gambiae s. l* obtenue à partir du spray catch durant la période d'étude dans les sites d'étude

5.1.2 Composition spécifique de la faune non vectrice du paludisme dans les sites d'étude à partir de la capture de nuit (CN)

Le *Culex* sp a été le plus prédominant (83,16%, n=563) tandis qu'*An. pharoensis* a été l'espèce la moins capturée (1,62%, n=11), (Figure 17).

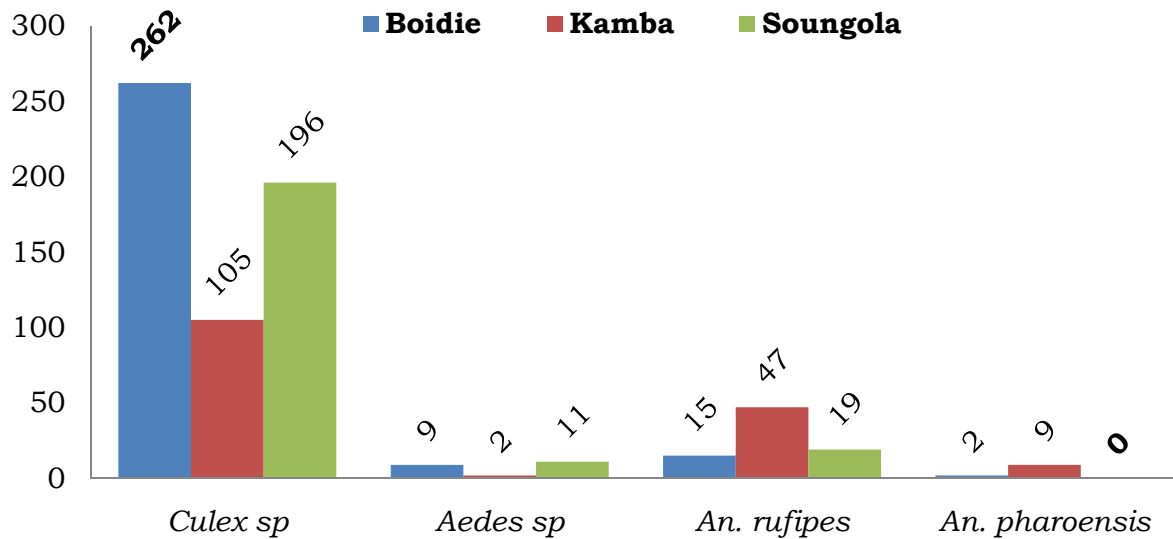


Figure 17 Composition de la faune non vectrice du paludisme à partir de la capture nocturne (CN) dans les sites d'étude

5.2 Structure moléculaire de la population vectrice dans les sites d'étude

Tableau 2 Fréquence des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae s. l* à Boidie de juin à octobre 2010

Espèces		<i>An. gambiae s. s</i>				<i>An. arabiensis</i>		TOTAL N
Localité	Mois	Forme M		Forme S		n	%	
		n	%	n	%			
Boidie	juin	6	85,72	0	0	1	14,28	7
	juillet	97	87,39	10	9	4	3,61	111
	août	84	77,77	18	16,67	6	5,56	108
	septembre	121	78,57	5	3,25	28	18,18	154
	octobre	90	86,54	0	0	14	13,46	104
	Total	398	82,23	33	6,82	53	10,95	484

La fréquence d'*An. gambiae s. s* était plus élevée que celle d'*An. arabiensis* pendant toute la période d'étude 89,05% contre 10,95%.

La fréquence la plus élevée d'*An. gambiae s. s* et *An. arabiensis* a été obtenue au mois de septembre.

Dans les 89,05% d'*An. gambiae s. s*, la fréquence de la forme moléculaire M était plus élevée que celle de la forme moléculaire S pendant toute la période d'étude 82,23% contre 6,82% (Tableau 2).

Tableau 3 Fréquence des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae s. l* à Kamba de juin à octobre 2010

Espèces		<i>An. gambiae s. s</i>				<i>An. arabiensis</i>		TOTAL N
Localité	Mois	Forme M		Forme S		n	%	
		n	%	n	%			
Kamba	juin	6	100	0	0	0	0	6
	juillet	191	93,62	7	3,44	6	2,94	204
	août	118	86,76	13	9,56	5	3,68	136
	septembre	108	70,58	6	3,93	39	25,49	153
	octobre	63	64,95	8	8,25	26	26,80	97
	Total	486	81,55	34	5,70	76	12,75	596

La fréquence d'*An. gambiae s. s* était plus élevée que celle d'*An. arabiensis* pendant toute la période d'étude, 87,25% contre 12,75%.

La fréquence la plus élevée d'*An. gambiae s. s* a été obtenue au mois de juillet et *An. arabiensis* au mois de septembre.

Dans les 87,25% d'*An. gambiae s. s*, la fréquence de la forme moléculaire M était plus élevée que celle de la forme moléculaire S pendant toute la période d'étude 81,55% contre 5,70% (Tableau 3).

Tableau 4 Fréquence des espèces et formes moléculaires d'*An. gambiae s. l* à Soungola de juin à octobre 2010

Espèces		<i>An. gambiae s. s</i>				<i>An. arabiensis</i>		TOTAL N
Localité	Mois	Forme M		Forme S		n	%	
		n	%	n	%			
Soungola	juin	7	100	0	0	0	0	7
	juillet	45	97,82	0	0	1	2,18	46
	août	91	85,04	12	11,22	4	3,74	107
	septembre	150	94,34	5	3,14	4	2,52	159
	octobre	22	61,12	0	0	14	38,88	36
	Total	315	88,74	17	4,79	23	6,47	355

La fréquence d'*An. gambiae s. s* était plus élevée que celle d'*An. arabiensis* pendant toute la période d'étude, 93,53% contre 6,47%.

La fréquence la plus élevée d'*An. gambiae s. s* a été obtenue au mois de septembre et *An. arabiensis* au mois d'août.

Dans les 93,53% d'*An. gambiae s. s*, la fréquence de la forme moléculaire M était plus élevée que celle de la forme moléculaire S pendant toute la période d'étude 88,74% Contre 4,79% (Tableau 4).

5.2.1 Densité et pluviométrie

Les plus faibles densités sont observées aux mois de Juin et d'octobre tandis que les plus élevées sont observées en août et septembre (0,3 à 70,76).

Le pic pluviométrique a été observé au mois d'août (304,4 mm³). Il n'ya pas de superposition entre la densité et la pluviométrie mais toute fois la remarque est, qu'une élévation de la pluviométrie était suivi d'une élévation de la densité le mois suivant (Figure 18).

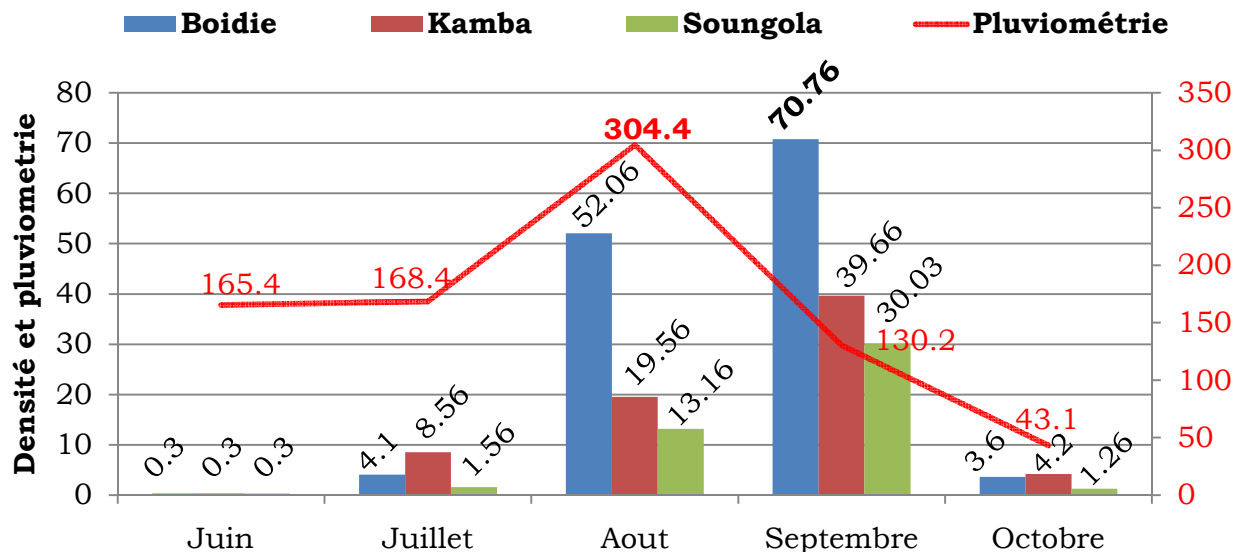


Figure 18 La densité anophélienne comparée à la pluviométrie après Spray Catch par site d'étude de juin à octobre 2010

5.2.2 Taux d'infection

Le taux d'infection des moustiques à *P. falciparum* a été (0) au mois de juin dans les trois villages, et le fort taux d'infection a été de (14,95%, n=108) de moustiques infectés à Boidie au mois d'octobre (Figure 19).

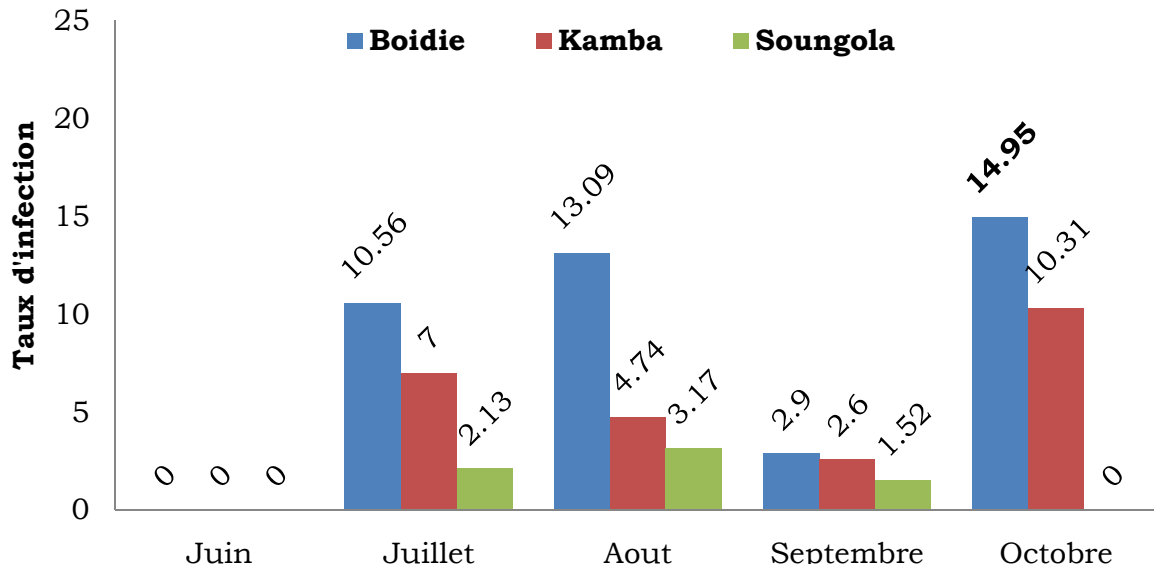


Figure 19 Taux d'infection par site d'étude de juin à octobre 2010

5.2.3 Agressivité des vecteurs par capture par aspersion d'insecticides

Le nombre de piqûre par personne et par nuit le plus faible a été observé au mois de juin (0,85) et le plus élevé au mois de septembre (380,97) dans le même village de Boidie (Figure 20).

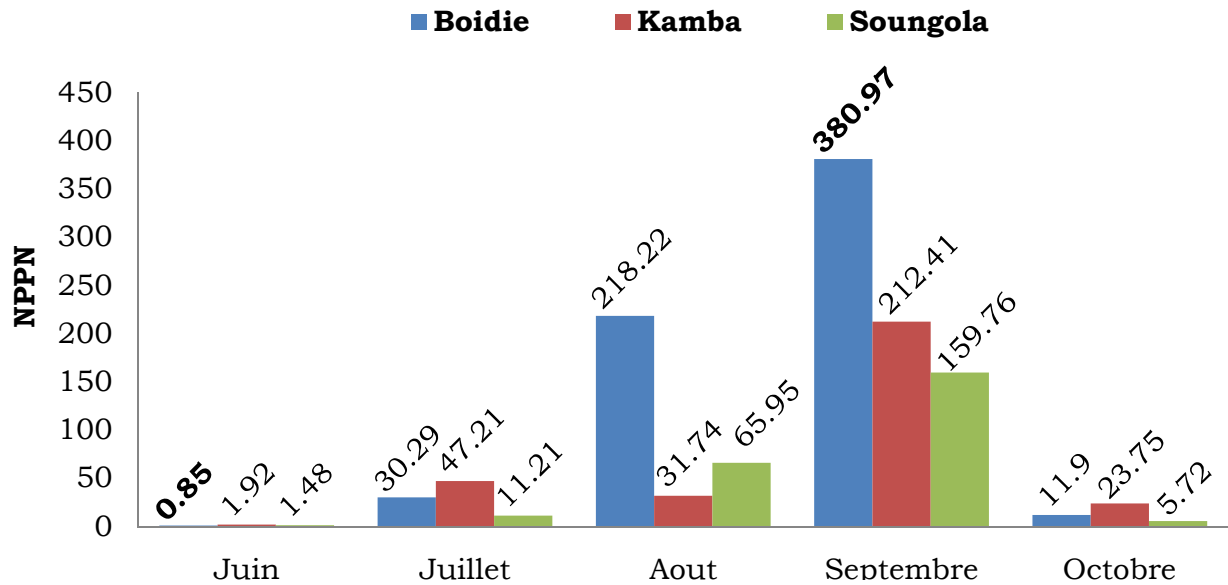


Figure 20 Variation mensuelle de l'agressivité par site d'étude de juin à octobre 2010

5.2.4 Taux d'anthropophilie

Le taux le plus faible d'*An. gambiae s.l.* a été observé au mois de septembre (28,84%, n=2123) et le taux le plus élevé au mois de juin à Boidie (100%, n=9), (Figure 21).

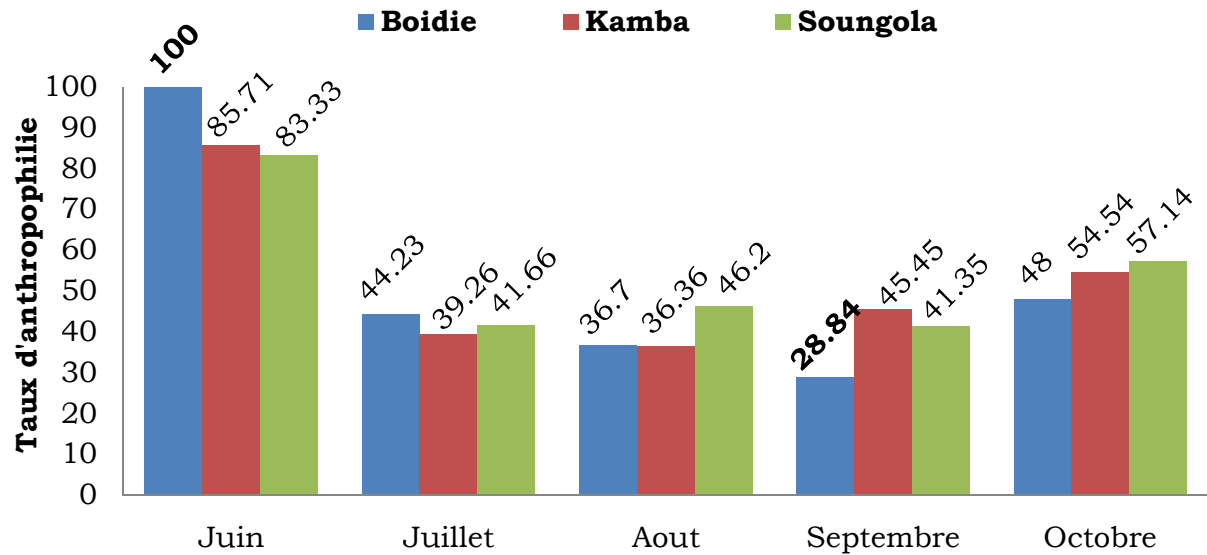


Figure 21 Taux d'anthropophilie d'*An. gambiae s.l.* durant la période de transmission par site d'étude de juin à octobre 2010

5.2.5 Taux d'inoculation Entomologique

Le taux d'inoculation entomologique le plus élevé a été observé à Boidie 28,37 piqûres infectantes par personne et par nuit durant le mois d'août (Figure 22).

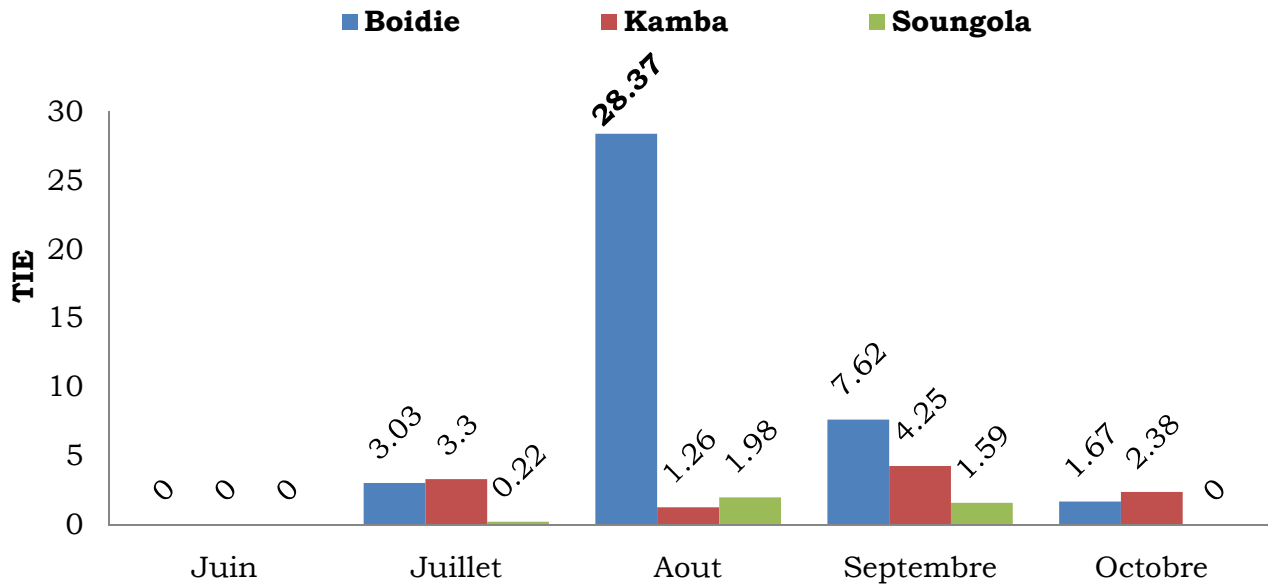


Figure 22 Variations mensuelles du taux d'inoculation entomologique par site d'étude de juin à octobre 2010

5.2.6 Taux de parturité

Au mois de juillet il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre la parturité à l'intérieur et l'extérieur des cases $P=0,35$ $\text{Chi}^2=0,94$.

Au mois d'août la différence était statistiquement significative entre la parturité à l'intérieur et l'extérieur des cases $P=0,022$ $\text{Chi}^2=5,30$.

Au mois de septembre il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre la parturité à l'intérieur et l'extérieur des cases $P=0,39$ $\text{Chi}^2=0,77$.

Au mois d'octobre il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre la parturité à l'intérieur et l'extérieur des cases $P=0,41$ $\text{Chi}^2=0,68$ (Tableau 5).

Tableau 5 Variations du taux de parturité mensuel par sites d'étude

Mois ►	Juin		Juillet		Aout		Septembre		Octobre	
	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext
Localités ▼										
Boidie	6	0	10	9	62	35	98	83	15	8
Kamba	0	0	13	17	22	18	61	56	2	3
Soungola	0	0	16	10	50	44	81	82	2	3
Total pare	6	0	39	36	134	97	240	221	19	14
Total dissequé	8	0	47	39	146	119	270	257	22	14
Taux de parité	75,0	0	82,9	92,3	91,7	81,5	88,8	85,9	86,3	100

- **Int** = intérieur des chambres
- **Ext** = extérieur des chambres

5.2.7 Habitudes trophiques

Les moustiques ont tendance à avoir un comportement endophage qu'exophage dans les trois localités d'étude (Figure 23).

A Boidiè, la différence entre l'endophagie et l'exophagie était statistiquement significative $P=0,046$ $\text{Chi}^2=4$.

A Kamba, ainsi qu'à Soungola il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre l'endophagie et l'exophagie $P=0,45$ $\text{Chi}^2=0,58$, $P=0,65$ $\text{Chi}^2=0,20$ respectivement.

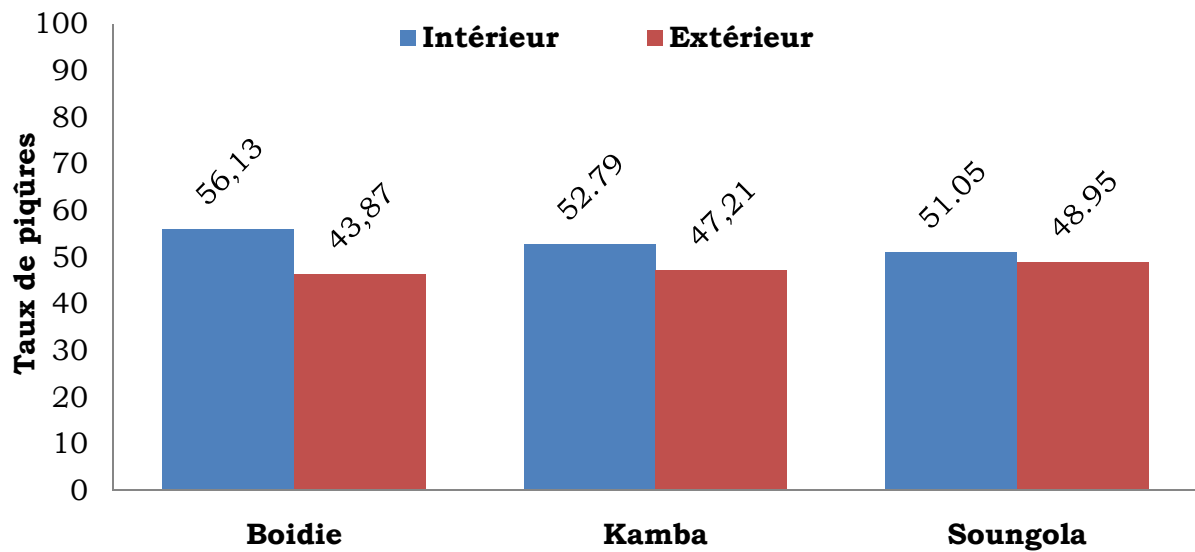


Figure 23 Etude du taux de piqûres sur homme par site d'étude de juin à octobre 2010

5.3 Test de susceptibilité du complexe d'*An. gambiae*

Les moustiques utilisés pour les tests sont issus de la première génération de femelles sauvages capturées par aspirateur à bouche dans les trois villages (Boidie, Kamba, Soungola).

5.3.1 Temps de Knockdown 50 et 90 (KDT50 et KDT90) dans les sites d'étude

Le temps au bout duquel 50% des moustiques étaient Knockdown (KDT50) a été de 30mn, 40mn, 50mn, 70mn respectivement pour la permethrine, la lambdacyhalothrine, la deltaméthrine et le DDT ; tandis que le KDT90 a été obtenu à 80mn pour la permethrine et la lambdacyhalothrine (Figure24).

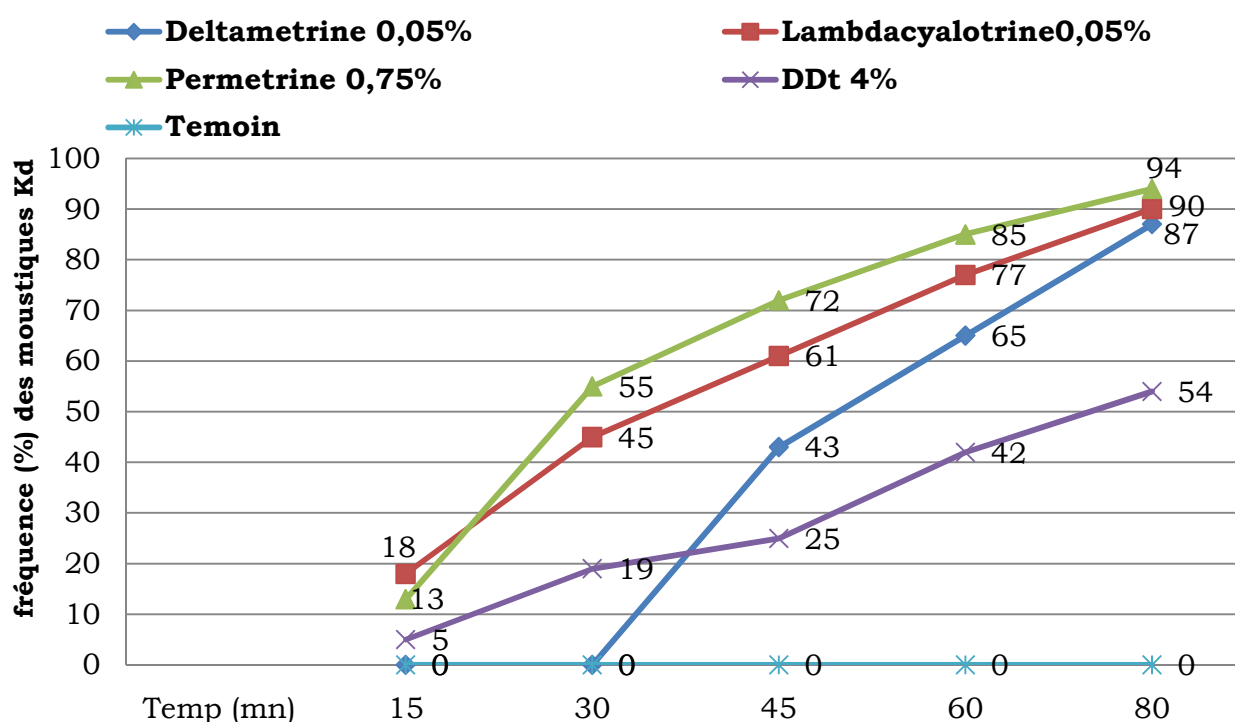


Figure 24 Temps de Knock-down (KDT) dans le village de Boidiè

Le KDT50 a été de 20mn, 45mn, 50mn, 70mn pour la permethrine, la lambdacyhalothrine, le DDT, et la deltaméthrine respectivement ; et le KDT90 pour la permethrine seule à 80mn (Figure 25).

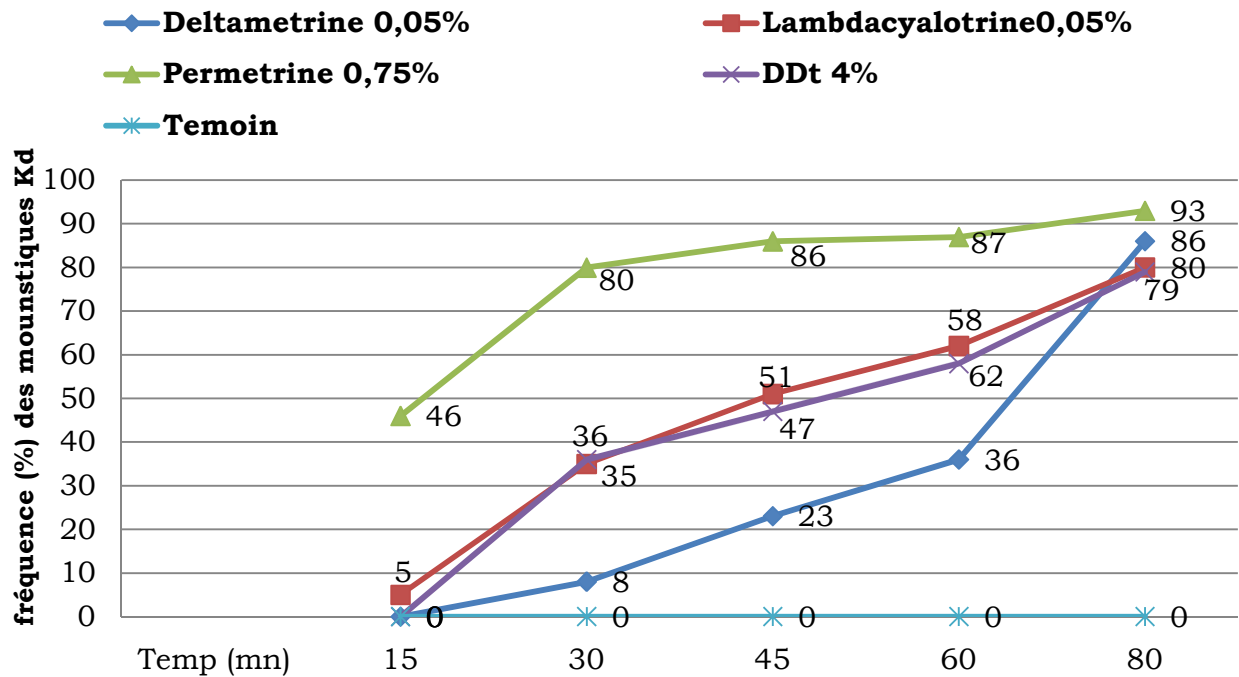


Figure 25 Temps de Knock-down (KDT) dans le village de Kamba

Le KDT50 a été de 22mn, 30mn, 45mn, 70mn pour la permethrine, la deltaméthrine, la lambdacyhalothrine, et le DDT respectivement ; et le KDT90 pour la permethrine et la deltaméthrine à 80mn (Figure26).

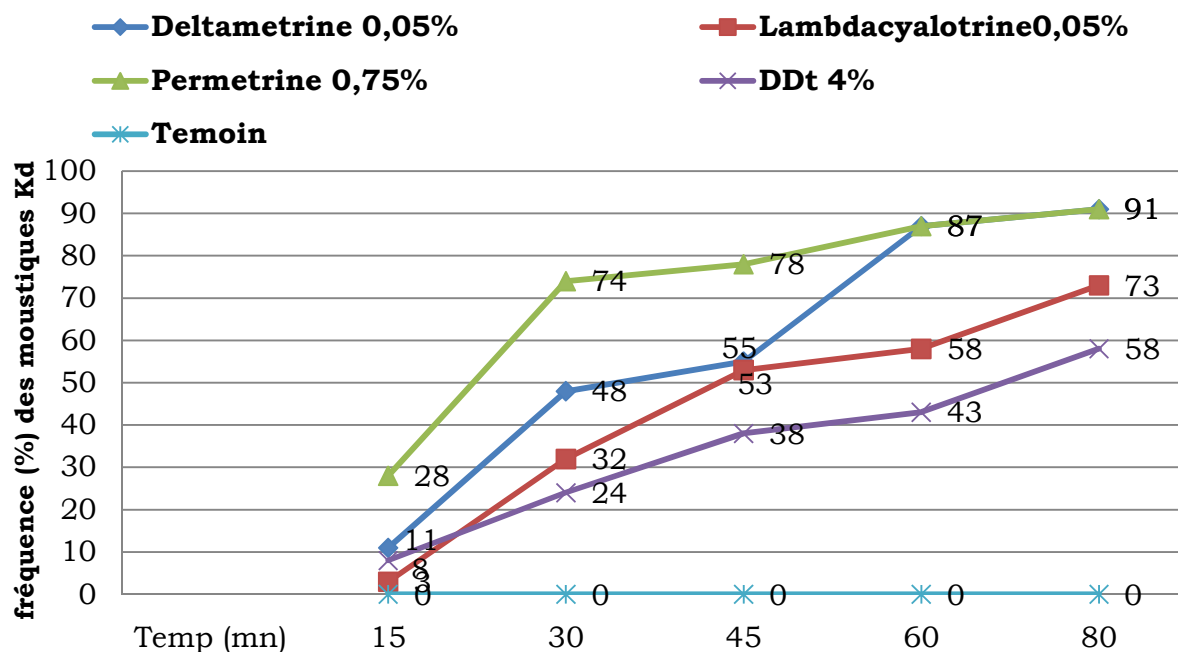


Figure 26 Temps de Knock-down (KDT) dans le village de Soungola

5.3.2 Taux de mortalité après 24 heures des moustiques soumis aux différents insecticides.

Dans ces villages, le taux de mortalité a varié de 42% pour la Lambdacyhalothrine à 100% pour le Bendiocarbe. Seul le bendiocarbe était efficace avec une mortalité à 100%. Les moustiques ont présenté une résistance aux autres insecticides testés (Figure 27).

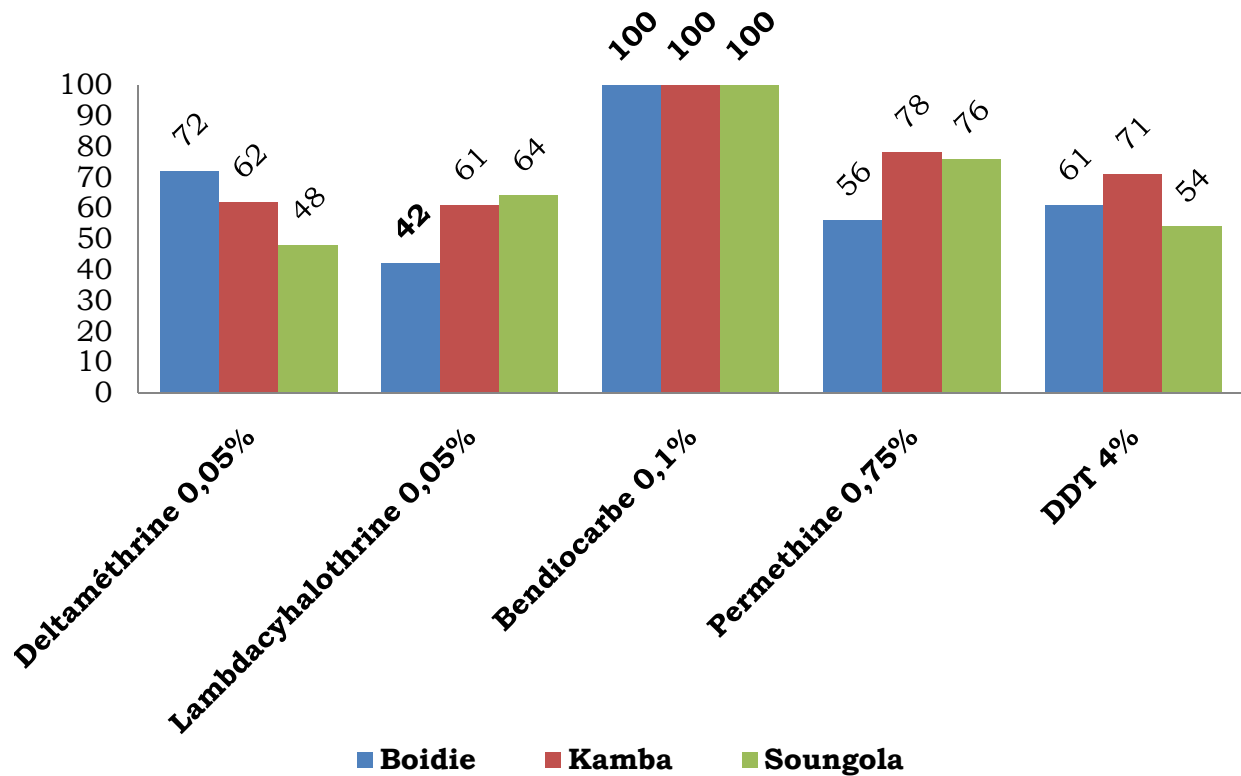


Figure 27 Taux de Mortalité à 24 heures d'*An. gambiae s.l* exposé aux différents insecticides

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

La présente étude, est une évaluation des paramètres entomologiques de la transmission du paludisme et de la susceptibilité du complexe *Anopheles gambiae* à la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine, au bendiocarbe, à la perméthrine, et au DDT; dans le cercle de Barouéli en prélude à la pulvérisation intra domiciliaire (PID).

L'étude s'est déroulée de juin à octobre 2010 couvrant une période de transmission entière au Mali. La période est bien indiquée pour évaluer la transmission du paludisme dans la région.

6.1 Composition vectorielle

L'espèce vectrice rencontrée a été l'*An. gambiae s. l* dans l'ensemble des villages. Elle se compose d'*An. gambiae s. s* et d'*An. arabiensis*. La présente étude montre que la fréquence d'*An. gambiae s. s* prédomine sur celle d'*An. arabiensis* dans tous les sites et pendant toute la période d'étude, Sangaré D. en 2000 à Donéguébougou et Traoré M. en 2008, à Koulikoro et Bla avaient trouvé des résultats similaires.

La fréquence des formes moléculaires M était supérieure à celle des formes moléculaires S dans tous les villages, ce qui est comparable aux résultats de Traoré M. en 2008.

En plus du complexe *Anopheles gambiae s. l*, dans la faune anophelienne il y avait *An. rufipes* et *An. pharoensis* et dans la faune culicidienne *Culex sp* et *Aedes sp*; Traoré M. 2008 avait trouvé les mêmes espèces.

6.2 Etudes entomologiques de la transmission

Les paramètres entomologiques ont été mesurés avec les moustiques issus des captures du spray-catch et de la capture de nuit des cinq mois d'étude (juin-octobre 2010).

La pluviométrie a atteint son pic au mois d'août mais n'était pas superposée à la densité anophelienne et son élévation était suivi d'une élévation de la densité le mois suivant.

L'agressivité (m .a) a été calculée avec les femelles issues du spray-catch dans l'après midi. Elle a varié de façon significative, d'un village à l'autre, de 0,85 piqûres par personne et par nuit (PPN) au mois de juin à 380,97 PPN au mois de septembre à Boidie. Par contre Traoré M. en 2008 a trouvé des chiffres respectivement inférieurs avec la plus faible valeur 0,4 à Bagadadji cercle de Bla et la plus forte valeur 5,4 à Kolimana cercle de Koulikoro. Cette différence pourrait s'expliquer par un effectif relativement faible dans l'étude de Traoré M.

L'indice d'antigène sporozoïtique (IAS) a subi des variations mensuelles d'un village à l'autre 0 à 0,14. Le même auteur ci-dessus cité a trouvé des chiffres supérieurs comparativement à la présente étude 1,3 à 9,3.

L'un des indicateurs de performance de la pulvérisation intra domiciliaire est d'écourter la vie des moustiques. Le taux de parturité mesure l'âge physiologique des moustiques. Ces résultats constituent des références auxquelles les taux obtenus après la pulvérisation pourraient être comparés. La différence entre le taux de piqûre à l'intérieur (endophagie) et le taux de piqûre à l'extérieur (exophagie) n'était pas statistiquement significative dans les trois villages d'études excepté Boidiè. Ces résultats montrent que certaines populations vectrices ont une propension à piquer dehors. Ce qui amènerait à penser à une transmission active dehors. Ceci contraste avec la croyance générale selon laquelle la majorité des piqûres se passe à l'intérieur des chambres. Il serait donc important de multiplier de telles études afin de disposer d'avantage d'évidences. Ces évidences pourraient être utilisées pour faire un plaidoyer auprès des preneurs de décision, des bailleurs de fonds pour chercher des solutions à cette transmission qui se passe dehors, les stratégies majeures de lutte actuelles visant les moustiques qui piquent et se reposent à l'intérieur.

Le taux d'inoculation entomologique (TIE) a varié de 0 piqûres infectantes par personne par nuit dans les trois villages au mois de juin à 28,37 piqûre infectante par personne par nuit au mois d'août à Boidie. Ce taux nul serait dû à la faible taille des échantillons récoltés durant ce mois. Traoré M. en

2008 a trouvé des valeurs inférieures comparativement à cette étude 0,79 à Bagadadji et 12,6 à Kolimana.

6.3 Susceptibilité d'*An. gambiae s. l.* aux insecticides

Les tests avec les insecticides cités ci-dessus ont été réalisés avec des tubes OMS (voir le kit de bio-essais de l'OMS dans la méthodologie).

Les moustiques utilisés pour les tests étaient issus de la première génération de femelles sauvages capturées à l'aide d'un aspirateur, dans les trois villages (Boidie, Kamba, Soungola). Au total 620 femelles de moustiques ont été utilisées par villages dont 125 moustiques testés par insecticide par village par mois et 25 moustiques comme contrôle par test. Les moustiques étaient répartis à raison de 25 par tube.

En ce qui concerne le taux de knockdown, la permethrine a été le meilleur insecticide avec le KDT50 obtenu avant 30mn et le KDT90 avant 80mn dans les 3 villages, suivit de la deltaméthrine, la lambdacyhalothrine et enfin le DDT qui subissaient des fluctuations selon les villages.

Le taux de mortalité à 24heures a varié de 42% pour la lambdacyhalothrine à Boidie à 100% pour le bendiocarbe pour l'ensemble des 3 villages.

Cependant le bendiocarbe a été l'insecticide le plus efficace (100%) de taux de mortalité à 24 heures dans les 3 villages ; Traoré M. en 2008 a trouvé le même résultat avec le bendiocarbe à Bla et Koulikoro.

NB : Le bendiocarbe n'a pas d'effet knockdown.

Ces résultats prouvent que le bendiocarbe est l'insecticide de choix pour la pulvérisation intra domiciliaire dans le cercle de Barouéli.

Concernant la technique utilisée pour le test d'insecticide Traoré M. en 2008 a utilisé des bouteilles alors que ce sont des tubes de bio-essai de l'OMS qui ont été utilisés dans cette étude.

Les résultats de la présente étude montrent un aperçu entomologique en ce qui concerne le paludisme dans le cercle de Barouéli. Cependant elle a des limites. L'étude s'est étendue sur trois villages ; la variation spatiale serait peut-être beaucoup plus visible si plusieurs villages étaient inclus. Une autre limite de la présente étude se situe au niveau de l'analyse de la résistance aux insecticides. En effet l'analyse moléculaire pour la

confirmation de l'implication du gène kdr n'a pas été effectuée. Malgré ces insuffisances cette étude reste une base scientifique pour orienter le programme national de lutte contre le paludisme dans le choix des stratégies de lutte anti vectorielle dans le cercle de Barouéli. Elle décrit les espèces et formes moléculaires du vecteur. Elle décrit le comportement de piqûres dudit vecteur. Enfin elle définit l'insecticide le plus efficace. Cette étude a permis au programme national de lutte contre le paludisme de choisir le bendiocarbe pour la campagne de PID de 2011 à Barouéli.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Conclusion

Il ressort de cette étude que la seule espèce vectrice rencontrée a été *An. gambiae s. l* dans nos villages d'étude. *An. gambiae s. l* est composée d'*An. gambiae s. s* et d'*An. arabiensis*. Les formes moléculaires M et S ont été les composantes de l'*An. gambiae s. s* retrouvées.

Le taux d'inoculation entomologique, servira à évaluer l'impact de la pulvérisation intra domiciliaire sur le niveau de transmission.

Il ressort de cette étude qu'*An. gambiae s. l* est susceptible à cent pour cent (100%) au seul insecticides qu'est le bendiocarbe.

La permethrine a été le second insecticide le plus efficace après le bendiocarbe, et par conséquent peut être utilisé en alternance ou en cas de manquement du bendiocarbe.

7.2 Recommandations

A la lumière des résultats de cette étude nous recommandons :

✓ Aux PNL

D'utiliser le bendiocarbe dans la pulvérisation intra domiciliaire du cercle de Barouéli.

✓ Aux chercheurs

- Effectuer des tests périodiques de sensibilité pour la détection précoce de la résistance.
- Faire une évaluation rigoureuse de la rémanence du bendiocarbe dans les chambres pulvérisées.
- Faire l'identification moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae* testées à l'insecticide.

✓ Aux populations des sites d'étude

De bien coopérer pour les activités de recherche.

8. BIBLIOGRAPHIE

- 1. Adam.J.P., Binson.G., Bailly.H., Eyraud.M., and Hamon.J. 1958.**
Presence of a gene of resistance to dieldrin in *Anopheles gambiae* Giles, in the Lower Ivory Coast (French East Afrika). Bull Soc Pathol Exot 1958 51: 326-329.
- 2. Akogbeto.M., and Yakoubou.S. 1999.** Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. . Bull Soc Pathol Exot 92: 123-130.
- 3. Ameyya.DA., Koekemoer.LL., Vaughan.A., Morgan.JC., Brooke.BD., and e. a. Hunt.RH. 2005.** Isolation and sequence analysis of P450 genes from a pyrethrinoid resistant colony of the major malaria vector *Anopheles funestus*. DNS Seq 2005 16: 435-445.
- 4. Anonyme., and I. r. spraying. 2006.** Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. WHO position statement. . WHO /HTM / MAL: 1112.
- 5. Anonyme., and WHOPES. 2007.** recommended long-lasting insecticidal mosquito nets (LNs). www.who.int/whopes.
- 6. Brooke B.D., Kloke G., Hunt R.H., Koekermor L.L., Temu E.A., Taylor ME. and al.** Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern Africa *Anopheles funestus* (Dipteria: Culcidae). Bull Entomol Res: 265-273.
- 7. Burkot et al 1984.** Technique d'ELISA Sandwich.

8. **Beier.JC., Perkins.P.V., Wirts.R.A., Koros.J., Diggs.D., Gargan.T.P., and K. D.K. 1988.** Bloodmeal identification by direct enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J.Med Entomol* 25: 1-9.
9. **Casimiro.S., Coleman.M., Hemingway.J., and Sharp.B. 2006.** Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. *J.Med Entomol* 43: 276-282.
10. **Casimiro.SL., Hemingway.J., Sharp.BL., and Coleman.M. 2007.** Monitoring the operational impact of insecticide usage for malaria control on *Anopheles funestus* from Mozambique. . *Malar J* 2003 ; 6: 142.
11. **Choi.HW., Breman.JG., Teutsh.SM., Liu.S., Hightower.AW., and Sexton.JD. 1995.** The effectiveness of insecticide-impregnated bed net in reducing case of malaria infection: a meta analysis of published results. . *Am J Trop Med Hyg* 52: 377-382.
12. **Chouaibou.M., Etang.J., Brévault.T., Nwane.P., Hinzoumbé.CK., and e. a. Mimpfoundi.R. 2008.** Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae s.l.* from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon . *Trop Med Int Health*. 13: 476-486.
13. **Clement.A. 1992.** Developement, Nutrition and reproduction Chapman and Hall The biology of mosquitoes.
14. **Coetzee.M., and F. D. 2004.** Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector in Africa. . *Insect biochem Mol boil* 34.
15. **Coluzzi.M., Petrarca.V., and Di Deco.M.A. 2003.** Chomosomal inversion intergradations and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* 52: 45.

- 16. Coluzzi.M., Sabatini.A., Petrarca.V., and Di Deco.M.A. 1979.** Chromosomal differentiation and adaptation to environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 483.
- 17. Constantini.C., Sagnon.N., Ilbondo-Sanogo.E., Coluzzi.M., and Boccolini.D. 1999.** Chromosomal and bionomic heterogeneties suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parasitologia* 41: 595:199.
- 18. Coz.J., Davidson.G., Chauvet.G., and Hamon.J. 1968.** La résistance des Anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et Madagascar. . *Cahier ORSTOM Serie Ent Med Parasitol* 6: 207-210.
- 19. Curtis.CF., Jana-Kara.B., and Maxwell.CA. 2003.** Insecticide treated nets: impact on vector populations and relevance of initial intensity of transmission and pyretroid resistance. *J Vector Borne Dis* 40: 1-8.
- 20. Darriet.F. 1991.** Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyréthrinoides dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parasitologia* 33: 111-119.
- 21. Darriet.F., N'Guessan.R., and Carnevale.P. 2000.** Evaluation en cases-pièges de l'effet protecteur de moustiquaires non imprégnées d'insecticide dans la prévention des piqûres d'*Anopheles gambiae* s.s. *Santé* 10: 413-417.
- 22. Djogbénou.L., Dabiré.R., Diabaté.A., Kengne.P., Akogbéto.M., Hougard.JM. et al 2008.** Resistance of *Anophèles gambiae* to pyrethroids in Cote d'Ivoire. . *Ann Soc Belg Med trop* 73: 291-294.

- 23. Elissa.N., Mouchet.J., Riviere.F., Meunier.JY., and Yao.K. 1993.** Resistance of *Anophèles gambiae* to pyrethroids in Cote d'Ivoire. . *Ann Soc Belg Med trop* 73: 291-294.
- 24. Elissa.N., Mouchet.J., Riviere.F., Meunier.JY., and Yao.K. 1994.** Sensibilité d'*Anopheles gambiae* aux insecticides en Cote d'Ivoire. *Santé* 4: 95-99.
- 25. Entomologie du paludisme et lutte contre les vecteurs.pdf page 43**
- 26. Etang.J., Chouaibou.M., Toto.JC., Faye.O., Manga.L., and e. a. Samè-Ekobo.A. 2007.** A preliminary test of the protective efficacy of permethrin-treated bed nets in an area of *Anopheles gambiae* metabolic resistance to pyrethroids in north Cameroon. . *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 881-884.
- 27. Fanello.C., Petrarca.V., della Torre.A., Santolamazza.F., Dolo.G., Coulibaly.M., and al. 2003.** The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. Gambiae* s.s. . *Insect Mol Biol* 12: 241-245.
- 28. Fanello F.C., Santolamazza, and D. T. A. 2002.** Simultaneous identification of species and molecular forms of *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol* 16(4): 461-464.
- 29. Favia G., Lafrancotti A., Spanos L., Siden-Kiamos I., and Louis C. 2001.** Molecular characterization of ribosomal forms DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. . *Insect Mol Biol* 10(1): 19-23.
- 30. Fontenille.D., Cohutel.A.P.H., Awoono-Ambene., Antonio-Nkondjio.C., Wondji.C., Kengne.P., and al. 2003.** Systématique et

biologie des Anopheles vecteurs de plasmodium en Afrique, Données recentes. . Med Trop 63: 231.

- 31. Hamon.J., and Garret-Jones.C. 1963.** La résistance aux insecticides chez les vecteurs majeurs du paludisme et son importance opérationnelle. *Bull World Health Organ* 28: 1-24.
- 32. Hargreaves.K., Koekemoer.LL., Brooke.BD., Hunt.RH., Mthembu.J., and Coetzee.M. 2000.** *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 14: 181-189.
- 33. Hemingway.J. 1983.** Biochemical studies on malathion resistance in *Anopheles arabiensis* from Soudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 477-480.
- 34. Holstein.M. 1949.** Guide pratique de l'anophelisme en Afrique de l'Ouest française (A.O.F). *Service Général d'hygiene Mobile et de Prophylaxie, Dakar, pp: 54.*
- 35. Hunt.RH., Coetzee.M., and Fettne.M. 1998.** The *Anopheles gambiae* complex: a nex species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 231.
- 36. Kaufman.C., and Briegel.H. 2004.** Flyght performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. . *J Vector Ecol.* 29 (1): 140-153.
- 37. Martinez-Torres.D., Chandre.F., Williamson.MS., Darriet.F., Bergé.JB., and e. a. Devonshire.AL. 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major vector *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Mol Biol* 7: 179-184.

- 38. N'Guessan.R., Darriet.F., Guillet.P., Carnevale.P., Traoré-Lamizana.M., and e. a. Corbel.V. 2003.** Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Ved Entomol* 17: 19-25.
- 39. OMS. 1981.** Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des moustiques aux insecticides.
- 40. OMS. 2011.** Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde 1-11.
- 41. Page.F., Orlandi-Pradines.E., and Corbel.V. 2007.** Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecines et maladies infectieuses* 37: 153-161.
- 42. Sangaré D. 2000.** Dynamique des populations d'*Anopheles gambiae* sl, d'*Anopheles funestus* et de *Plasmodium falciparum* dans le système de transmission par relais du paludisme à Donéguébougou (Arrondissement central de Kati). ISFRA, Bamako-Mali. Thèse de Doctorat 3e Cycle: Entomologie et Paragitologie.
- 43. Singh B., Kim sung L., Matusop A., Radharishnan A., Shamsul S.S., Cox-Singh J., and al. 2004.** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infection in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024.
- 44. SLIS. 2010.** Taux d'incidence du paludisme grave et simple dans la population générale au Mali. Ministère de la santé: 97-98.
- 45. Snow R.W., Guerra C. A., Noor A.M., Myint H., and Hay S. 2005.** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 434: 214-217.

- 46. Touré Yéya. 1979.** Bio-écologie des anophèles (*DIPTERA-CULICIDEA*) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali; Incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de bancroft (Village de Banambani, arrondissement de Kati). Centre Pédagogique Supérieur de Bamako, thèse de 3e cycle Entomologie: Bamako, Mali.
- 47. Touré.YT. 1982.** Etude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. *Cahiers ORSTOM Serie Ent Med Parasitol* 20: 125-131.
- 48. Toure Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maiga H.M., Sankaré O., and al. 1998.** The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parasitologia* 40 (4): 477-511.
- 49. Traoré.M., 2008.** Situation de la transmission du paludisme et de la résistance aux insecticides d'*An. gambiae* s. l. en prélude à la pulvérisation intra domiciliaire à Niala (Bla) et à Niamona (Koulikoro): 52-53.
- 50. Tripet.F., Wright.J., and Lanzaro.G. 2006.** A new high-performance PCR diagnostic for the detection of pyrethroid knockdown resistance kdr in *Anopheles gambiae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74 (4): 658-662.
- 51. Vulule.JM., Beach.RF., Atieli.FK., McAllister.JC., Brogdon.WG., and e. a. Roberts.JM. 1999.** Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol* 13: 239-324.
- 52. Weill.M., Malcolm.C., Chandre.F., Mogensen.K., Berthomieu.A., and e. a. Marquine.M. 2004.** The unique mutation in ace-1 giving high

insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13: 1-7.

53. Wilkes.TJ., Matola.YG., and Charlowood.JD. 1996. *Anopheles rivulorum*, vector of human malaria in Afrika. *Vet Entomol* 10: 108.

54. Wirtz et al 1987. Technique d'ELISA modifiée.

55. Yawson.AE., McCall.PJ., Wilson;MD., and Donnelly.MJ. 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. . *Med Vet Entomol* 18: 372-377.

56. Zaim.M., Aitio.A., and Nakashima.N. 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Ceterinary Entomology* 14: 1-5.

http://fr.wikipedia.org/wiki/Plasmodium_falciparum

<http://www.pathexo.fr/documents/notices/laveran.html>

<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:18733>

<http://sites-test.uclouvain.be/stages->

[hygtrop/Wery/plasmodiums/wery1202.html](http://sites-test.uclouvain.be/stages-hygtrop/Wery/plasmodiums/wery1202.html)

http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCD_T_1999_0147_SIMARD.pdf

Danis Mouchet et Simard

15%20Module%20entomo%202010%20-%20Pennetier%20-

%20Resistance%20aux%20insecticides

9 ANNEXES

9.1 Recherche des femelles infestantes

La recherche de la protéine circum sporozoïtique a été réalisée à partir des têtes-thorax par ELISA. La protéine est couplée à un anticorps monoclonal de capture fixé sur les parois de la plaque.

Le complexe anticorps-antigène ainsi formé est révélé par un anticorps monoclonal conjugué à une peroxydase.

La recherche de la protéine circum sporozoïtique concerne uniquement le *P. falciparum* dans cette étude. (*P. malariae*, *P. ovale* ont une fréquence faible, *P. vivax* est quasiment absent en Afrique au sud du Sahara (Mazier, 1991).

9.1.2 Protocole (ELISA)

9.1.3 Préparation des solutions :

-PBS

-PBS 9,7g

- 1 litre d'eau distillée,

- Solution de lavage (PBS Tween20) :

- dissoudre 9,65g de PBS dans 1000ml d'eau distillée et ajouter 500µl de Tween 20.

-Solutions des contrôles positifs :

- Dissoudre 25µg de réactif dans 25µl d'eau distillée,

- Tube I: mettre 5µl de la solution de contrôle dans 500µl de BB,

- Tube II: mettre 10µl du tube I dans 1000µl de BB,

- Tube III: mettre 10µl du tube II dans 500µl de BB.

- **Solution d'anticorps monoclonal non marqué**

Pour une plaque : 5ml de PBS et ajouter 20µl d'anticorps.

- **Solution d'anticorps monoclonal marqué**

Pour une plaque : 5ml de BB et ajouter 10µl d'anticorps.

- **Solution révélatrice**

Pour une plaque prendre 5ml de l'ABTS peroxydase substrat et 5ml de peroxydase solution B les mélanger assez bien par l'agitateur.

- **Solution BBNP40:**

Faire le mélange de 5ml de BB plus 25 μ l de NP40 et avec l'agitateur agiter pendant 15mn.

- **Solution de BB (Blocking Buffer) pour 1 volume de 500ml:**

- Il faut:

2,5g de caséine (0,5%),

50ml de NaOH (0,1N),

450ml de PBS (PH=7),

0,05g de Thimersol,

0,01g de phénol rouge.

- Prendre 100ml de NAOH à 0,1N plus 5g de caséine et faire bouillir l'ensemble tout en agitant le mélange,

- une fois en ébullition arrêter le chauffage et ajouter petit à petit 900ml de PBS tout en agitant doucement,

- ajouter ensuite le Thimersol et le phénol rouge et laisser refroidir,

- le PH est ensuite ajusté à 7,4 par addition de goutte de HCl.

- Révélateur à la peroxydase : pour une plaque, prendre 5ml de la solution de peroxydase A et 5ml de la solution de peroxydase B.

- **Mode opératoire:**

- Mettre individuellement les tête-thorax dans les tubes Eppendorf de 1,5ml ;

- Porter les références (date, lieu et méthode de capture, l'espèce capturée) ;

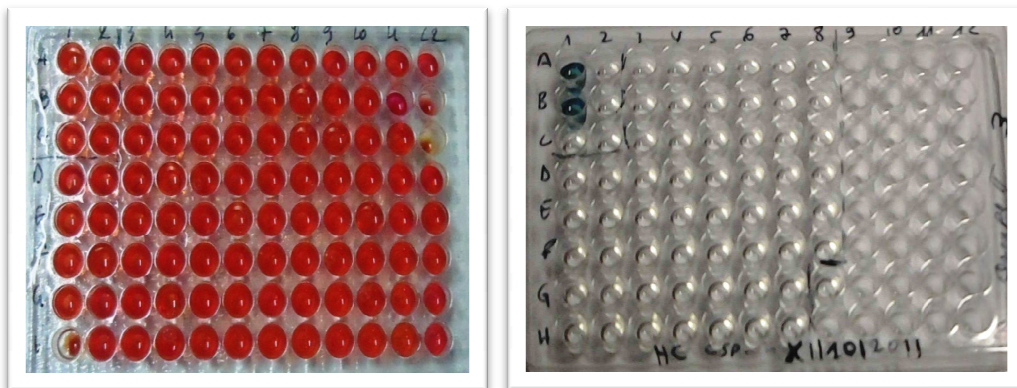
- Ajouter 50 μ l de BBNP40 (Nonidetp-40) dans chaque tube ;

- Ecraser mécaniquement à l'aide de petits pilons et ajouter 200 μ l de BB pour obtenir un volume final de 250 μ l dans les tubes ;

- Déposer 50 μ l de l'anticorps monoclonal non marqué dans chaque puits d'une plaque de microtitration et laisser incuber pendant 30 minutes à la température ambiante ;

- Aspirer l'anticorps non marqué, mettre 200 μ l de BB (Blocking Buffer) et laisser incuber une heure de temps ;

- Aspirer le BB, puis mettre 50µl de chaque broyat de moustique dans les puits correspondants ;
- Mettre en même temps les contrôles positifs et négatifs dans les puits correspondants et laisser incuber pendant deux heures,
- Aspirer les broyats de moustiques et laver les plaques deux fois avec du PBS-TWEEN (solution de lavage);
- Déposer 50µl d'anticorps monoclonal marqué à la peroxydase dans chaque puits et laisser incuber pendant une heure;
- Aspirer l'anticorps monoclonal marqué et laver trois fois les plaques avec du PBS-TWEEN;
- Ajouter 100µl de substrat révélateur (substrat ABTS) par puits;
- Faire la lecture visuellement à partir de la coloration après 30 à 60 minutes: les puits de la plaque colorés en vert contiennent les moustiques positifs.



Plaque sensibilisée

Plaque avec deux contrôles positifs (1.A et 1.B)

Figure 28 Photo montrant les différentes plaques pour les tests d'ELISA

9. 2 La Polymerase Chain Reaction (PCR) Ou Réaction de polymérisation en chaîne

La PCR a été mise au point en 1985 par *Karry Mullis*. Cette technique a permis de donner un coup de pouce au diagnostic bio-médical.

Le principe consiste à amplifier en quelques heures, un brin d'ADN en plusieurs copies identiques. Elle utilise la propriété semi-conservative de l'ADN pour synthétiser le brin complémentaire à partir des petites molécules simples ou amorces. Les bases se séparent ou s'apparient deux à deux d'un

brin à l'autre (A avec T, G avec C), sous l'action d'agents chimiques ou de la chaleur (dénaturation). Pour se répliquer, les deux brins se séparent et servent de matrice à la synthèse d'un nouveau brin. Les amorces spécifiques utilisées vont se fixer sur les régions homologues correspondantes du génome pour les amplifier (étape d'hybridation et d'extension). Ces différentes réactions sont effectuées à l'aide d'une enzyme polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* (*Taq polymerase*). Le processus d'amplification (PCR) se fait suivant trois étapes : la dénaturation de l'ADN double brins, l'hybridation des amorces et l'extension des brins complémentaires synthétisés. La séquence cible doit être connue ou au moins celles des deux régions contiguës. Deux nucléotides complémentaires de ces régions encadrant la cible sont synthétisés. Ces oligonucléotides serviront d'amorces pour la synthèse de la séquence cible à la suite d'un cycle de dénaturation et de reconstitution qui conduit à la réplification de la région encadrée par les amorces et à l'amplification exponentielle de la séquence cible.

Il est également possible d'utiliser l'ARN comme matrice. Dans ce cas, il faudrait au préalable effectuer une transcription reverse de l'ARN en ADN. Cette variante de la PCR est appelée « Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction » (RT-PCR).

9.2.1 Technique d'Identification des membres du complexe *An. gambiae* par la technique de la PCR (*An. Arabiensis* et *An. gambiae* s.s. (Scott *et al*, 1993)

Les abdomens des moustiques (*An. gambiae* s.l.) gravides issus des captures par aspirateur à bouche ont été traités à la PCR en vue de déterminer l'espèce A (*An. gambiae* s.s.) et l'espèce B (*An. arabiensis*). L'avantage de cette technique réside dans le fait, qu'elle permet l'identification d'espèce quel que soit son sexe, son état de réplétion et son stade de développement (larves ou adultes).

La technique consiste à extraire, amplifier, et révéler les bandes d'ADN des moustiques. La révélation se fait à partir de l'électrophorèse du produit de l'amplification.

9.2.2 Extraction de l'ADN du moustique:

a) Matériels nécessaires à l'extraction de l'ADN :

- Tubes de 1,5 ml sur les quels on portera les références des moustiques.
- Pipettes Gilson P1000, P200, P100, P20, uniquement destinées à l'extraction d'ADN.
- Pilon(ou écraseur de moustiques)
- Bain-marie
- Centrifugeuse
- Appareil à vortex.
- Agitateur

b) Produits nécessaires à l'extraction de l'ADN

- Acétate de potassium
- Tampon d'extraction comprenant :
- Ethanol à 70%, à 100%
- Tris-EDTA
- Glace-pilée
- Eau distillée

c) Méthode d'extraction d'ADN du moustique :

Elle a été faite exclusivement sur l'abdomen des moustiques capturés dont la portion tête-thorax a été utilisée pour l'ELISA.

- les tubes Eppendorf de 1,5 ml sont numérotés conformément à l'étiquette accompagnant chaque moustique;
- mettre 50 µl de "grinding buffer"(tampon d'extraction) dans chaque tube contenant le moustique; triturer avec le pilon jusqu'à l'écrasement complet du moustique;
- incuber au bain-marie à 65°C pendant 30mn;

- ajouter 7µl d'acétate de potassium à 8 moles pendant que les tubes sont encore chauds; bien mélanger l'ensemble en tapotant sur le tube;
- faire refroidir sur la glace pendant 30 mn;
- centrifuger à 14000 tours/mn pendant 15 mn et transférer le surnageant dans des tubes Eppendorf contenant 100 µl d'éthanol à 100%; bien mélanger;
- verser le surnageant sur du papier hygiénique;
- ajouter 100 µl d'éthanol à 70%, centrifuger 5 mn;
- verser le surnageant et laisser sécher les tubes contenant l'ADN
- dissoudre l'ADN ainsi extrait et purifier dans 100 µl de Tris-EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid) ou dans de l'eau distillée et stérile; conserver à -4°C jusqu'à l'amplification.

Tableau 6 Concentration des réactifs à l'identification des espèces

	Espèces	
Réactifs	1 reaction	N X reactions
H2O sterile	5.94	5.94
10 X buffer	1.25	1.25
dNTPs	2.00	2.00
Mgcl2	1.00	1.00
GA	0.25	0.25
AR	0.25	0.25
UN	0.25	0.25

Taq	0.06	0.06
AND	1.00	1.00
Total	12.00	12.00

Spécificité	Amorces /Primers							Taille
	5' -GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT- 3'							-
UN	5'-AAGTGTCCT	TCT	CCA	TCC	TA			-3
AR	315pb							
GA	5'-CTG	GTT	TGG	TCG	GCA	CGT	TT	- 3
	390pb							

- **Amorces utilisées :**

D'après Scott et al., 1993.
Pb=aires de bases

Tableau 7 Séquences nucléotidiques des amorces utilisées dans l'identification des espèces d'*An. gambiae* s. s.

- **Amplification de l'ADN extrait du moustique**

Elle se passe dans une machine programmable de type **PTC® 100** ou **200** (**P**rogrammable **T**hermal **C**ontroller **100** ou **200**), il se produit un ensemble de phénomènes cycliques. Un cycle comprend trois principales étapes:

- i) La dénaturation à 94°C au cours de laquelle les deux brins de la molécule d'ADN se séparent ;

- ii) L'appariement à 50°C où les amorces par le jeu le complémentarité des bases (A-T; C-G) se fixent sur les différents brins séparés.
- iii) L'extension à 72°C où sous l'action de la Taq polymérase les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) viennent compléter l'action des amorces. Ce processus a lieu selon un programme introduit d'avance comprenant 30 cycles.

• **Cycle d'amplification:**

Dénaturation de l'ADN matrice → 94°C pendant 30 secondes ;
Appariement des amorces → 50°C pendant 30 secondes ;
Extension → 72°C pendant 30 secondes.

} Ce cycle est répété 30 fois.



Figure 29 Photo d'une machine programmable d'amplification de PCR (Type PTC® 200)

- **Electrophorèse et interprétation**

Les molécules d'ADN amplifiées migrent sur un gel d'agarose à 2%.

- **Préparation du gel d'agarose :**

- Peser la quantité d'agarose dans un erlenmeyer de 500ml (soit 2 g pour 100ml de TBE 0.5X).
- Mettre erlenmeyer au four a micro-onde pendant deux minutes (2mn) pour solubiliser l'agarose.
- Refroidir le mélange sous un jet d'eau.
- Ajouter 5ul de Bromure d'Ethidium (10mg/ml) pour obtenir une concentration de 0,5mm/ml de gel d'agarose, puis homogénéiser la solution en secouant l'erlenmeyer. Le bromure d'éthidium sert de révélateur en présence de rayon Ultrat violet (U.V.), il donne une fluorescence orange au gel, qui est intense au niveau des bandes d'ADN.
- Couler le gel dans le moule portant les peignes, en prenant soin d'enlever les bulles formées à l'aide d'un cône.
- Attendre pendant 20 minutes, enlever les peignes après polymérisation de l'agarose.
- Transférer le gel dans le bac a électrophorèse contenant du tampon TBE 0.5X.

Le gel doit être entièrement recouvert de tampon.

- **Distribution des amplifiats d'ADN**

- Déposer des gouttes de bleu de charge □□loading buffer□ (bleu de Bromophenol 0,25%, bleu de Xylène cyanol 0,25%, glycérol 30% et l'eau distillée) sur le parafilm étale sur la paillasse. Le bleu de charge augmente la densité de l'amplifiats, ce qui empêche sa diffusion dans la solution du bac.

La coloration bleue permet de repérer le front de migration sur le gel.

- Mettre 2ul de marqueur de taille (100 paires de bases) mélange au bleu de charge dans les premiers puits de chaque rangée.
- Distribuer 10ul d'amplifiats mélange avec du bleu de charge par puits.
- Refermer le bac, puis régler les paramètres du générateur électrique (150 volets, 150 ampeurs) laisser migrer pendant 1heure.

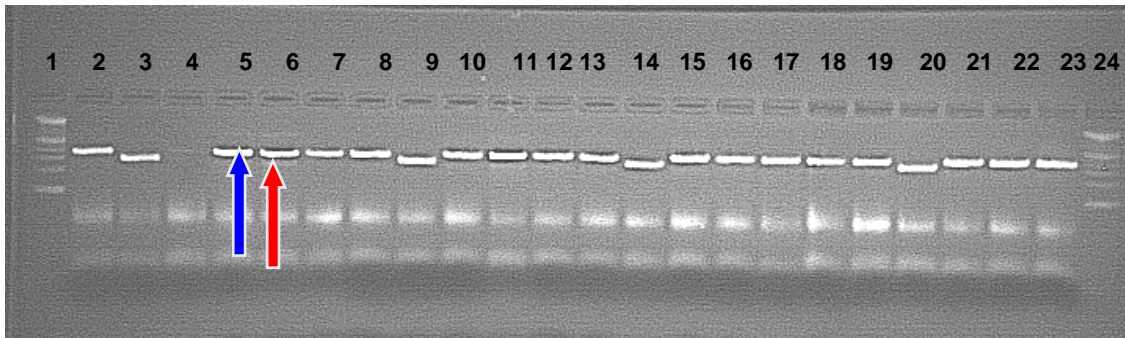
- Observer le gel sous la lumière ultraviolet (U.V.) dans une chambre noire avant de photographier le gel.

L'interprétation se fait à partir de la photo prise.

• **Analyse des résultats :**

Les bandes obtenues sont comparées à celles du marqueur de taille pour déterminer la taille des différents fragments d'ADN. La bande correspondant à *An.arabiensis* possède 315 paires de bases, celle d'*An.gambiae* 390 paires de bases (Scott et al.,1993).Les échantillons dont les bandes migreront à un des niveaux correspondant sont de cette espèce. Les résultats sont ensuite enregistrés.

NB : Après la migration, les bandes ont été visualisées à l'aide d'une boîte à UV et ensuite photographiées par une camera "GENE FLASH"



1 : Marqueur (100Bp), 2 : Contrôle *gambiae* (390Bp),

3: Contrôle *arabiensis* (315Bp), 4 : Contrôle négatif

5, 6, 7, 8, 10,11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22 et 23 : Echantillons identifiés *gambiae* ; 9,14 et 20 : Echantillons identifiés *arabiensis*.

NB : Les bandes en avance sont les **arabiensis** (exemple : flèche en rouge) ; Les bandes en arrière sont des **gambiae s.s** (exemple : flèche en bleu).

Figure 30 Photo d'un gel d'identification d'espèce d'*An. gambiae* s. l et d'*An. arabiensis* par la méthode de Scott et al., (1993)



Figure 31 Photo d'une machine imageur pour gels d'électrophorèse d'ADN (Gene flash)

Etude entomologique de base en prélude à la pulvérisation intra domiciliaire dans la
commune rurale de Boidie, cercle de Barouéli

CAPTURE DANS LES HABITATIONS HUMAINES

METHODE DE CAPTURE : SPRAY-CATCH

LOCALITES :.....

DATE...../...../2010

NOMBRE DE CASES PROSPECTEES:

ESPECES CAPTUREES: *An. gambiae s.l*

No	Types	Propriétaires	Chef de famille	Dorm	Jeûn	Gorg.	S.grav	Gtav.	Total	Autres especes
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
Total										

FICHE DE DISSECTION DE CAPTURE DE NUIT

Village :
Date :

Espèce disséquée :
Nombre disséqué :

INT/ EXT	Poste	Tranche horaire	No	Espèce	Réplétion	Parité	Autre espèce

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : CAMARA
Prénom : Ladj

Titre : Etude entomologique de base en prélude à la pulvérisation intra domiciliaire dans la commune rurale de Boidie, cercle de Barouéli.

Année de soutenance : 2012

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de médecine et d'odontostomatologie (FMOS).

Secteur d'intérêt : Santé publique et entomologie médicale.

Résumé :

Dans sa politique de lutte contre le paludisme le Mali, avec l'appui des partenaires, notamment l'USAID/PMI, a conduit la pulvérisation intra domiciliaire dans deux cercles (Koulikoro et Bla) de 2008 à 2010. Dans le souci d'étendre la pulvérisation à un troisième cercle (Barouéli) la présente étude a été initiée dans le cercle de Barouéli, en vue de collecter des informations entomologiques de base sur le vecteur du paludisme avant la PID. L'étude a été menée dans 3 villages du cercle de Barouéli : Boidie, Kamba et Soungola.

An gambiae s. l a été le seul vecteur du paludisme retrouvé dans les différents sites. Celui-ci, était composé d'*An. gambiae s. s* et *An. arabiensis* avec une prédominance d'*An. gambiae s. s* (89,94% contre 10,06%). Parmi *An. gambiae s. s* la forme moléculaire M a été plus fréquente que la forme moléculaire S (84,17% contre 15,83%). La densité a variée de 0,3 à 70,76 ; l'agressivité a variée de 0,85 à 380,97PPN. La proportion de moustiques piquant à l'intérieur 56,13% et celle piquant à l'extérieur 43,87%.

Le taux d'inoculation entomologique a varié entre 0 piqûres infectantes par homme par nuit et 28 piqûres infectantes par homme par nuit.

Des tests de susceptibilité à différents insecticides ont montré que le bendiocarbe était le seul insecticide efficace sur *An. gambiae s.l.* dans les différents sites d'étude. Ce qui suggère que le bendiocarbe est l'insecticide qui pourrait être le mieux utilisé pour la pulvérisation intra domiciliaire.

Mots clés : Paludisme, insecticide, pulvérisation intra domiciliaire.

xcPersonal details card

Last name: CAMARA

First name: Ladj

Title: Entomological baseline study in prelude of indoor residual spraying in the rural area of Boidie, district of Barouéli.

Year of defense: 2012

City of defense: Bamako

Country of origin: Mali

Registration of copy: Library of Faculty of Medicine and Dentistry (FMOS).

Area of interest: Public Health and Medical Entomology.

Summary:

In its malaria control policy, Mali, with supports from its partners, i.e. USAID/PMI, has conducted indoors residual spraying in two districts (Koulikoro and Bla) from 2008 to 2010. In the goal of extending IRS to a third district (Baroueli) the present study was initiated in the Baroueli district in order to collect preliminary entomologic data in prelude of IRS. The study was conducted in 3 villages in the Baroueli district: Boidie, Kamba and Soungola.

Anopheles gambiae s.l. was the only malaria vector encountered at the different sites. It was composed of *An. gambiae s.s.* and *An. arabiensis* *An. gambiae s.s.* predominating (89.94% vs 10.06%). Within *An. gambiae s.s.* the M molecular form had higher frequencies compared to the s molecular form (84.17% vs 15.83%). The density 0,3 à 70,76; the man biting rate 0,85 à 380,97PPN. The proportion of mosquito biting indoor 56,13% à the proportion of mosquito biting outdoor 43,87%.

The entomologic inoculation rates varied between 0 and 28 infecting bites per person per night.

Susceptibility tests to different insecticides showed that bendiocarb was the only efficacious insecticide on *An. gambiae s.l.* at the sites. That allowed us to suggest bendiocarbe as the insecticide for IRS

Key words: Malaria, insecticide, Indoor Residual Spraying.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette faculté et de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail ; je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception. Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

JE LE JURE