Manuel de Formation à l'Entomologie du Paludisme

A l'intention des techniciens en entomologie et lutte anti-vectorielle
(Niveau de base)

Septembre 2012

Ce manuel a été élaboré et produit par RTI International, à l'intention de l'Agence américaine pour le développement international.

USAID FROM THE AMERICAN PEOPLE

PRESIDENT'S MALARIA INITIATIVE

CDC Centers for Disease Control and Prevention

RTI INTERNATIONAL

Pan American Health Organization

Regional Office of the World Health Organization

Manuel de Formation à l'Entomologie du Paludisme

A l'intention des techniciens en entomologie et lutte anti-vectorielle

(Niveau de base)

Gestion intégrée des vecteurs du paludisme et des autres maladies infectieuses – Tâche Numéro 2
Contrat GHA-I-02-04-00007-00

Produit pour
l'Agence américaine pour le développement international

Auteurs
Jacob Williams
RTI International
3040 Cornwallis Road
Post Office Box 12194
Research Triangle Park, NC 27709-2194, U.S.A.

et

Joao Pinto
Unidade de Parasitologia Médica/CMDT.LA
Instituto de Higiene e MedicinaTropical, Universidade Nova de Lisboa
Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

RTI International est l'une des institutions de recherche leaders au monde, dévoué à l'amélioration des conditions de vie humaines à travers la mise en pratiques des connaissances. Avec un personnel de plus de 2 800 employés, RTI offre une recherche et une expertise technique aux gouvernements et aux entreprises de plus de 40 pays dans les domaines de la santé et des produits pharmaceutiques, de l'éducation et de la formation, des enquêtes et statistiques, des technologies avancées, du développement international, des politiques économiques et sociales, de l'énergie et l'environnement, des services chimique et de laboratoire. Pour en savoir plus, aller sur le site www.rti.org.

RTI est un nom commercial de la "*Research Triangle Institute*".

Le présent document ne reflète pas nécessairement l'opinion de l'Agence américaine pour le développement international ni celle du gouvernement des Etats-Unis.

Remerciements

RTI International adresse ses sincères remerciements à :

- J. Derek Charlwood (Liverpool School of Tropical Medicine) et Carla A. Sousa (Instituto de Higiene e Medicina Tropical-IHMT), pour leur contribution photographique au manuel.
- Maria Paz Ade (Organisation panaméricaine de la santé – OPS/OMS), Allison Belemvire (USAID), Keith Carter (Organisation panaméricaine de la santé – OPS/OMS), Gracella W. Cooper (Programme national libérien de lutte antipaludique), Rainier Escalada (Organisation panaméricaine de la santé – OPS/OMS), Josiane Etang, Christen Fornadel (USAID), Christian Frederickson (Organisation Panaméricaine de la Santé – OPS/OMS), John Githure (RTI International), Michael Macdonald, Jake O'Sullivan (RTI International), Norma Padilla (Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala), Carla A. Sousa (IHMT), Marco Fidel Suarez, Kathryn Welter (RTI International) et Susan Youll (USAID), pour leur analyse critique du contenu du manuel.

Table des matières

Page

Remerciements iii

Figures vi

Tableaux vii

Introduction 1

Objectif du manuel 1

Audience visée 2

Glossaire 4

Unité 1 La lutte antipaludique et le rôle de l'entomologie 6

1.1 Principales composantes des plans stratégiques de lutte contre le paludisme 6

1.2 Principes de base dans la planification des opérations de lutte contre les vecteurs du paludisme et rôle de l'entomologie 9

Unité 2 La biologie des vecteurs du paludisme 12

2.1 Parasites, vecteurs et transmission du paludisme 12

2.2 Cycle de vie du moustique *Anophèle* 12

2.3 Gites larvaires et facteurs affectant l'émergence d'adultes à partir d'habitats aquatiques 15

2.4 Déterminants de l'importance médicale chez les adultes 17

Unité 3 L'anatomie et l'identification des moustiques 18

3.1 Comment distinguer les œufs d'anophèles de ceux des autres culicidés 18

3.2 Comment distinguer les larves d'anophèles de celles des autres culicidés 19

3.3 La nymphe 20

3.4 Comment distinguer les moustiques anophèles des autres culicidés 21

3.5 Techniques d'identification des espèces de moustiques 23

Unité 4 La diversité des vecteurs du paludisme 24

4.1 Complexes d'espèces jumelles 24

4.2 Les vecteurs du paludisme aux Amériques 25

4.3 Les vecteurs du paludisme en Afrique 26

4.4 Les vecteurs du paludisme en Asie 28

Unité 5 La collecte de moustiques aux stades larvaires 30

5.1 Méthodes d'échantillonnage 31

5.2 Enregistrement des informations de collectes 33

5.3 Transport de larves vivantes 33
5.4 Conservation des échantillons 34
5.5 Estimation des paramètres larvaires 34
Unité 6 La collecte de moustiques au stade adulte 36
6.1 Méthodes de capture de moustiques adultes 36
6.2 Enregistrement des informations de collectes 43
6.3 Conservation des échantillons 44
Unité 7 La préparation et la conservation des échantillons de moustiques 45
7.1 Principales techniques de laboratoire 45
7.2 Traitement des échantillons de moustiques 47
7.3 Réactifs et équipement de base 48
7.4 Bonnes pratiques de laboratoire 49
Unité 8 Les indices de la transmission du paludisme et les facteurs associés 50
8.1 Incrimination des vecteurs du paludisme 50
8.2 Techniques utilisées pour incriminer les vecteurs 51
8.3 Estimation des indices de transmission 52
8.4 Facteurs affectant la transmission du paludisme 56
Unité 9 Les principes essentiels de l'élevage de moustiques en laboratoire 57
9.1 L'insectarium et son principe de base 57
9.2 Conditions générales d'élevage de moustiques 59
Unité 10 La sensibilité aux insecticides et les tests biologiques en cônes 62
10.1 Pourquoi déterminer la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides ? 62
10.2 Préparation de vecteurs pour des tests de sensibilité et évaluations biologiques en cônes 63
10.3 Détermination de la sensibilité des moustiques adultes 63
10.4 Efficacité résiduelle d'insecticide sur des surfaces traitées par pulvérisations (OMS 1998, 2005) 67
Annexe I : Exemple de programme de formation et de programmation du cours d'entomologie de base destiné aux techniciens 69
Annexes II :Exemples de formulaires de collecte de données en vue des études sur les moustiques aux stades larvaires et adulte 77

Figures

Figure 1. Différents stades du cycle biologique des Anophèles 13
Figure 2. Essaims d'Anophèles mâles au crépuscule pour l'accouplement..... 15
Figure 3. Types de gîtes de reproduction des moustiques..... 17
Figure 4. Exemples d'œufs d'*Aedes*, de *Culex* et d'*Anophèle*..... 19
Figure 5. Anatomie de la larve d'*Anophèle*..... 19
Figure 6. Différences entre les larves d'Anophèles et les larves de culicinés 20
Figure 7. Nymphe d'anophèle 21
Figure 8. Anatomie d'un moustique adulte 21
Figure 9. Différences entre les anophèles et les culicinés au niveau de la tête des mâles et des femelles 22
Figure 10. Position de repos des moustiques culicinés et des anophèles adultes..... 23
Figure 11. Equipement nécessaire pour la collecte de larves 31
Figure 12. Collecte des larves à l'aide d'un godet 32
Figure 13. Récolte des larves par pipetage 33
Figure 14. Equipement de base pour la capture manuelle de moustiques..... 37
Figure 15. Capture sur volontaire..... 38
Figure 16 : Collecte sur drap après pulvérisation au pyrèthre..... 40
Figure 17. Capture dans les lieux de repos extérieurs 41
Figure 18. Capture manuelle de moustiques au repos à l'intérieur des habitations..... 42
Figure 19 : Fenêtre-piège 43
Figure 20. Etat abdominal d'un moustique femelle en fonction de son stade gonotrophique51
Figure 21. Image d'un insectarium avec des plateaux de larves et des cages pour adultes 57
Figure 22. Plateau contenant des œufs et des larves de 1er stade 59
Figure 23. Séparation des nymphes des larves à l'aide d'une pipette..... 61
Figure 24. Sélection de la résistance aux insecticides chez les populations de vecteurs..... 63
Figure 25. Tubes OMS utilisés pour les tests de sensibilité 64
Figure 26. Mise en place du papier imprégné dans le tube d'exposition..... 65
Figure 27. Test biologique de l'OMS à l'aide des cônes fixés sur un mur 67
Figure 28. Tests biologiques de l'OMS effectués à l'aide des cônes sur une moustiquaire imprégnée d'insecticide..... 68

Tableaux

Tableau 1. Mesures de lutte contre les vecteurs du paludisme (OMS, 2006) 7

Tableau 2. Conditions nécessaires pour la réussite des interventions essentielles de lutte anti-vectorielle (l'OMS, 2006) 9

Tableau 3. Techniques de conservation des parties du moustique pour les analyses de laboratoire 48

Introduction

Le paludisme reste une importante cause de décès et de maladie dans la plupart des régions tropicales du monde, où il est endémique dans 106 pays. En 2010, sur un total de 216 millions de cas de paludisme, environ 81 % ont été enregistrés en Afrique et 13 % en Asie du Sud-Est[1]. La plus grande proportion (91 %) du nombre annuel de décès dus au paludisme, estimée à 665 000, est observée en Afrique, touchant principalement les enfants de moins de cinq ans (86 %). Dans la région des Amériques, plus de 670 000 cas de paludisme ont été confirmés en 2010, dont 133 décès. Sa transmission est active dans 21 pays, ce qui expose environ 20 % de la population des Amériques. Le paludisme engendre des contraintes sévères par rapport au développement économique et constitue un important facteur de pauvreté dans la plupart des pays où il sévit à l'état endémique.

Malgré une augmentation considérable du financement des programmes de lutte antipaludique, les objectifs de réduction fixés par l'initiative Roll Back Malaria[2] et divers programmes nationaux de lutte antipaludique n'ont pas encore été atteints dans bon nombre de pays. Ceci est dû en partie à un manque de capacités nécessaires pour générer des connaissances profondes sur l'épidémiologie de la maladie, en vue de guider la mise en œuvre et la gestion efficientes des programmes de lutte. Notamment, la capacité de suivi et de surveillance entomologiques reste rudimentaire dans bon nombre de pays endémiques. Il est donc primordial pour les programmes nationaux de lutte contre le paludisme, de former leur personnel en qualité et en quantité et de mobiliser les moyens, pour que ce personnel participe de façon efficace aux activités de lutte antipaludique.

Objectif du manuel

Un cours de formation en deux volets, destiné aux techniciens en entomologie, a été élaboré dans le but de faciliter le renforcement des capacités de base pour le suivi et la surveillance entomologiques, dans les pays où le paludisme est endémique. Le but de manuel est d'orienter un cours d'entomologie de base (premier niveau) qui couvre les unités suivantes :

1. Le cycle biologique et la bionomie des moustiques ;
2. L'échantillonnage des adultes et des larves, l'identification des moustiques et l'incrimination des vecteurs du paludisme ;
3. Les principaux indices de la transmission du paludisme et leurs déterminants ;
4. La lutte contre les vecteurs du paludisme et les principales interventions courantes :
5. Le rôle de l'entomologie dans la lutte anti-vectorielle :
6. Les principes de base pour l'élevage des moustiques en laboratoire ;

[1] OMS (2009). Rapport mondial sur le paludisme 2011. Organisation mondiale de la santé. Genève, Suisse (http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/)
[2] Roll Back Malaria – Partenariat mondial pour la lutte contre le paludisme (http://www.rbm.who.int/index.html)

7. Les tests de sensibilité des moustiques et de l'efficacité résiduelle des insecticides utilisés dans la lutte anti-vectorielle.

Ce manuel traite des questions essentielles liées aux différents objectifs d'apprentissage fixés. Toutefois, cette formation pourra offrir des possibilités de travaux de terrain, pour acquérir une expérience d'apprentissage plus élargie et consolider les connaissances/compétences pratiques. Une approche participative d'apprentissage des adultes est envisagée ; approche dans laquelle les participants devront être encouragés à découvrir d'eux-mêmes et auprès des autres. Un exemple de programme de formation et de programmation du cours d'entomologie de base destiné aux techniciens se trouve en Annexe I.

Audience visée

Ce manuel de base est destiné au personnel du niveau de district dans les pays où le paludisme est endémique, qui seront appelés à former les équipes chargées de la collecte et du rapportage des indicateurs entomologiques nécessaires pour lutte anti-vectorielle. Ils devront au préalable avoir un niveau d'instruction secondaire ou un diplôme dans un domaine qui se prête à une formation en entomologie.

Sources secondaires d'information

Ce manuel a été élaboré en s'inspirant de plusieurs documents existants sous forme de directives, de manuels ou d'articles publiés, dont les références sont les suivantes :

1. Benedict M (2009). *Methods in Anopheles research*. Malaria Research and Reference Reagent Center. Version 3. 264 pp
2. Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, Benz D, Gething, PW, Howes RE, Patil AP, Temperley WH, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Elyazar IR, Harbach RE, Hemingway J, Manguin S, Mbogo CM, Rubio-Palis Y, Godfray HC (2010) Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Medicine* 7: e1000209.
3. Manguin S, Garros C, Dusfour I, Harbach RE, Coosemans M (2008). Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 489-503.
4. Service MW, Townson H (2002). The *Anopheles* vector. In: *Essential Malariology*. Eds: DA Warrell and HM Gilles. 4th Ed. Arnold Publishers, London. 348 pp.
5. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors* 3: 72.
6. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Okara RM, Van Boeckel T, Godfray HC, Harbach RE, Hay SI (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the

Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors* 3: 117.

7. OMS (1975). *Manuel sur l'entomologie pratique dans le paludisme.* Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. 160 pp.
8. OMS (1992). *Techniques entomologiques pratiques pour la lutte antipaludique. 1ère partie : guide d'apprentissage*. Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. 77 pp.
9. OMS (1998). *Procédures de test pour la surveillance de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme, bio-efficacité et persistance d'insecticides sur des surfaces traitées*. Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. OMS/CDS/CPC/MAL/98.12
10. OMS (2002). *Pulvérisation à effet rémanent : manuel pour l'application de pulvérisations à effet rémanent pour une lutte antivectorielle.* Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. OMS/CDS/WHOPES/GCDPP/2000.3
11. OMS (2003a). *Lutte antipaludique dans la région africaine*. Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique, Harare, Zimbabwe.
12. OMS (2003b). *Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle : guide d'apprentissage*. Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse OMS/CDS/CPE/SMT/2002.18 Rév.1
13. OMS (2005). *Directives pour l'essai en laboratoire et sur le terrain de moustiquaires insecticides longue durée.* Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. OMS/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11
14. OMS (2006). *Lutte antivectorielle contre le paludisme et protection personnelle*. Série de rapports techniques de l'Organisation mondiale de la Santé, n° 936, Genève, Suisse. 62 pp.
15. OMS (2009). Rapport mondial sur le paludisme 2008. Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. OMS/HTM/GMP/2008.1

Glossaire

Anthropogène : Se dit de tout effet en rapport avec l'activité humaine dans la nature ou résultant de celle-ci.

Anticorps : Protéines particulières (appelées immunoglobulines) qui sont employées par le système immunitaire pour reconnaître et neutraliser des substances étrangères à l'intérieur du corps, telles que les virus, les bactéries ou parasites.

Bionomie : Quand il s'agit de moustiques, ce terme fait référence aux propriétés biologiques, écologiques et comportementales d'une espèce ou d'une population ayant une influence sur sa capacité à agir en tant que vecteur de maladie.

Chromosome polytène : Chromosomes géants formés par plusieurs copies du matériel génétique dont ils se composent. Ces chromosomes géants ne sont observés que dans certaines cellules d'insectes. Du fait de leur taille, les chromosomes polytènes sont très utiles dans une analyse cytogénétique.

Cycle sporogonique : Partie du cycle biologique du parasite du paludisme qui se déroule à l'intérieur du moustique. Il commence quand le moustique prélève du sang d'un hôte humain (ou autre vertébré) infecté. A l'intérieur de l'estomac du moustique, les stades sexués du parasite (gamétocytes) se transforment en gamètes mâles et femelles, qui s'accouplent pour former un œuf (ookinète) qui va se fixer sur la paroi cellulaire de l'estomac. L'ookinète se transforme en oocyste dans la face externe de la paroi stomacale. A l'intérieur de l'oocyste, un processus de division cellulaire (méiose) produit des sporozoïtes. L'oocyste éclate alors et libère les sporozoïtes qui vont envahir les glandes salivaires. Une fois dans les glandes salivaires, les sporozoïtes seront transmis à un hôte humain au cours du prochain repas de sang du moustique. Il existe des antipaludiques qui ciblent des stades particuliers du parasite durant le cycle sporogonique. Les médicaments gamétocytocides tels que la primaquine tuent les gamétocytes, alors que les sporontocides tuent les sporozoïtes.

Cytogénétique : Etude de la structure et de la fonction des chromosomes (structures héréditaires portant les gènes qui déterminent le sexe et les caractéristiques d'un organisme). Quand la cytogénétique est appliquée à l'identification et à l'étude des rapports entre des espèces biologiques, on l'appelle **cytotaxonomie**.

Dimorphisme sexuel : Différences caractéristiques entre mâles et femelles de la même espèce.

Epidémiologie : Etude de la distribution, des profils et des déterminants des phénomènes liés à la santé (les maladies par exemple) des populations, et la façon dont elle est appliquée à la lutte contre les maladies et les problèmes de santé.

Espèces biologiques : Groupe de populations ou d'organismes au sein d'une population, qui se croisent ou qui peuvent se croiser dans la nature et produire une descendance fertile.

Estivation : État végétatif, d'inactivité et d'endormissement auquel ont recours les organismes pour survivre aux élévations de température extrêmes et aux conditions arides imposées par la saison sèche.

Matériel génétique : Matériel biologique qui est présent dans tous les organismes vivants et qui peut être transmis d'une génération à l'autre (héréditaire). Le matériel génétique détermine la structure et la fonction des cellules qui forment un organisme. Un **gène** est une séquencé particulière du matériel génétique qui détermine une protéine particulière. Dans la cellule, le matériel génétique est organisé en structures appelées **chromosomes**.

Morphologie : Fait référence à la taille, la forme et la structure d'organismes ou aux parties du corps (internes et externes) qui les constituent. Le terme **anatomie** est souvent utilisé à la place de morphologie, du fait qu'elle étudie l'organisation et de la structure d'organismes.

Mutation génétique : Ce terme fait référence à tout changement dans la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène donné. Ces changements peuvent entraîner des modifications de la protéine pour laquelle code le gène. On appelle **mutants** les organismes portant la mutation, par opposition aux individus de type sauvage.

Parité : Nombre de fois qu'une femelle a donné naissance. On qualifie de pare un moustique femelle qui a pondu des œufs au moins une fois sans sa vie. On appelle nullipares les femelles qui n'ont pas encore pondu d'œufs.

Protéine : Composés biochimiques (molécules) qui constituent les cellules d'organismes vivants. Les protéines jouent un rôle dans toutes les fonctions biologiques.

Spiracles : Orifices circulaires présents dans le corps des insectes qui permet la pénétration de l'air dans le corps.

Sporozoïte : Etape du cycle de vie du parasite du paludisme chez le moustique qui est capable de produire une infection chez les hôtes humains (ou autres vertébrés). C'est donc le stade du parasite du paludisme qui est **infectant** pour l'homme. Les sporozoïtes se trouvent dans les glandes salivaires du moustique. La paroi cellulaire externe du sporozoïte est couverte d'une protéine spécifique à ce stade et appelée protéine **circumsporozoïtaire**. Cette protéine est celle que l'on recherche en laboratoire pour déterminer si un moustique est infectant (s'il est capable de transmettre le parasite du paludisme au moment de la piqûre) ou non.

Unité 1
La lutte antipaludique et le rôle de l'entomologie

Objectifs d'apprentissage

Cette unité d'apprentissage a pour but d'apporter des connaissances de base dans les domaines suivants :

- **Mesures préconisées dans la lutte contre le paludisme ;**
- **Principales mesures de lutte anti-vectorielle ;**
- **Rôle de l'entomologie dans la lutte antipaludique ;**
- **Facteurs essentiels à prendre en compte dans la planification des interventions contre les vecteurs du paludisme.**

1.1 Principales composantes des plans stratégiques de lutte contre le paludisme

Les plans stratégiques de lutte contre le paludisme comportent généralement trois composantes essentielles :

- Détection précoce et traitement efficace des cas de paludisme ;
- Lutte contre les moustiques vecteurs ;
- Education communautaire.

Détection précoce et traitement efficace des patients (chimiothérapie)

L'emploi d'antipaludiques est le principal outil dont on dispose pour réduire les densités parasitaires. Outre le traitement et la prophylaxie, les gamétocytocides et les sporontocides affectent le développement sporogonique du moustique et donc la transmission du paludisme.

Les programmes actuels de lutte antipaludique ont adoptés des stratégies de détection précoce et de traitement rapide des cas de paludisme. Ces stratégies impliquent la mise en place de centres de distribution de médicaments et de postes de diagnostic rapide au niveau des soins de santé primaires. Pour que ces stratégies soient efficaces, les personnes à risque doivent être informées des symptômes du paludisme et être prêtes à se faire traiter. La mise en service d'un personnel formé au sein de la communauté (*par ex.* agents de santé communautaire) pour identifier les cas de paludisme et faciliter l'accès à un traitement efficace s'est avéré capitale pour le traitement rapide des patients.

Plusieurs problèmes entravent cependant ces efforts, notamment :

- les obstacles liés à l'accessibilité de médicaments,
- la faible adhésion des populations à cause des raisons économiques et des effets secondaires de certains médicaments.

Par conséquent, les traitements ne sont pas souvent suivis jusqu'au bout, ce qui augmente les risques de la résistance du parasite aux médicaments. L'expansion et la généralisation de la résistance aux antipaludiques tels que la chloroquine et la pyriméthamine/sulfadoxine (Fansidar®) est un obstacle majeur à la pérennisation de la composante parasitologique des plans stratégiques de lutte contre le paludisme.

Lutte anti-vectorielle et principes de mise en œuvre

La lutte anti-vectorielle constitue une importante composante de la Stratégie mondiale de lutte contre le paludisme de l'Organisation Mondiale de la Santé. Elle demeure le moyen le plus efficace pour prévenir la transmission du paludisme. Elle est basée sur des mesures visant à réduire le contact homme-vecteurs et à réduire la densité des moustiques au stade infectant. Si ces mesures sont mises en place correctement, la transmission du parasite est réduite, ainsi que le nombre de cas de paludisme.

Actuellement, la lutte contre les vecteurs du paludisme repose essentiellement sur deux principales catégories d'interventions, principalement basées sur l'utilisation des insecticides, contre les larves ou contre les moustiques adultes (Tableau 1). .

Tableau 1. Mesures de lutte contre les vecteurs du paludisme (OMS, 2006)

Méthode	Mesure	Pour la protection individuelle et familiale	Pour la protection communautaire
Lutte contre les adultes	Réduction du contact homme-moustique	Moustiquaires imprégnées d'insecticide, anti-moustiques, vêtement de protection, pose de grillage-moustiquaire dans les maisons et autres améliorations intérieures	Moustiquaires imprégnées d'insecticide, zooprophylaxie
	Elimination des moustiques adultes		Moustiquaires imprégnées d'insecticide, Aspersions intra domiciliaires, pulvérisation spatiales, vaporisations à volume extrêmement réduit
Lutte contre les larves (gestion des sources larvaires)	Elimination des larves de moustique	Assainissement péri-domestique	Aspersion de larvicides sur les gîtes en eau, irrigation intermittente, drainage, lutte biologique
	Réduction des sources	Drainage à petite échelle	Assainissement de l'environnement, gestion des eaux, drainage

- **Gestion des sources larvaires (Larval Source Management : LSM):** Cette méthode a pour but de réduire le nombre de vecteurs atteignant le stade adulte. La LSM pourrait constituer une bonne intervention complémentaire, notamment dans des situations où la population de moustiques est dense et se caractérise par des gîtes

larvaires bien circonscrits et peu nombreux, notamment des zones sèches présentant des gîtes circonscrits et gérables (Tableau 2). La LSM peut se baser sur :

- des insecticides chimiques (*par ex.* le téméphos), des agents biologiques (*par ex.* des bactéries comme le *Bacillus thuringiensis israelensis - Bti*) ou des toxines qui tuent les larves et les nymphes ;
- des poissons larvivores comme *Gambusia affinis* et le guppy (*Poecilia reticulata*).
- l'application d'huile qui forme une pellicule sur l'eau, entravant ainsi la bonne respiration des larves et des nymphes ;
- l'emploi de régulateurs de croissance des insectes qui empêchent les larves d'atteindre le stade adulte ;
- la perturbation et l'élimination physique des gîtes larvaires pour empêcher le développement des moustiques. Là où ces changements sont permanent (*par ex.* drainage, comblement de plans d'eau et de fossés), cette intervention s'appelle modification environnementale.

- **Aspersions/pulvérisations intra domiciliaires d'insecticides à effet rémanent (Indoor Residual Spraying : IRS) :** Cette méthode vise le vecteur adulte. Elle consiste à l'aspersion des murs intérieurs des maisons avec des insecticides approuvés par l'OMS et présentant des propriétés rémanentes. Une fois appliqués, ces insecticides sèchent en laissant une fine couche de cristaux sur le mur. Le vecteur prélève l'insecticide quand il se pose sur le mur avant ou après son repas de sang. Il en meurt alors, s'il est sensible à l'insecticide utilisé pour pulvériser le mur. Certains des insecticides utilisés pour les IRS peuvent également avoir un effet répulsif et réduire ainsi le nombre de vecteurs entrant dans les pièces traitées.
- **Moustiquaires imprégnées d'insecticides (Insecticide Treated Nets : ITN) :** Cette méthode vise le vecteur adulte. La moustiquaire constitue une barrière efficace entre la personne qui dort en-dessous et le moustique vecteur. Ceci réduit les chances de piqûre et d'infection. L'insecticide en imprégnation permet également de tuer et de repousser tout vecteur susceptible de se poser sur la moustiquaire. Des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (Long Lasting Insecticidal Nets : **LLIN**) sont actuellement utilisées, elles ont une durée de vie de 2 à 3 ans. Il est indiqué aux programmes de lutte contre le paludisme de cibler au moins 80 % de la population à risque dans les zones d'intervention, car il a été démontré qu'un taux élevé de couverture permet d'obtenir une protection communautaire.

L'efficacité de chaque intervention est fonction d'un certain nombre de variables, notamment les caractéristiques bioécologiques des moustiques vecteurs, les propriétés de leur habitat et les aspects socio-économiques/culturels de la population humaine. Le Tableau 2 présente certaines des conditions nécessaires pour la réussite de ces trois principales interventions contre les vecteurs du paludisme.

Tableau 2. Conditions nécessaires pour la réussite des interventions essentielles de lutte anti-vectorielle (l'OMS, 2006)

Intervention	Condition
Aspersions intra domiciliaires d'insecticides à effet rémanent	• Les vecteurs se reposent principalement à l'intérieur (espèce endophile) ; • Les maisons ont des murs et des plafonds ; • La population humaine ciblée n'est pas nomade (résidence permanente) ; • Bonne mobilisation de la communauté pour maximiser la volonté de collaboration de la population, qui doit accepter l'aspersion et respecter les consignes de sécurité ; • Capacité du programme national à organiser une bonne campagne d'aspersion, en temps voulu, de toutes les maisons des zones ciblées, notamment des informations portant sur le nombre et l'emplacement des maisons à traiter.
Moustiquaires imprégnées d''insecticide	• La plupart des infections palustres sont contractées à l'intérieur (espèce endophage) ; • Au moins une proportion importante des piqûres de moustiques vecteurs a lieu quand les gens sont au lit. • Bonne mobilisation de la communauté pour maximiser la volonté de la population à utiliser correctement des moustiquaires ; • Système adéquat de distribution de moustiquaires imprégnées, notamment des informations portant sur le nombre et l'emplacement des maisons et du nombre de lits à équiper de moustiquaires ; • Capacité à organiser une campagne d'imprégnation gratuite de moustiquaires ou à passer à l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides longue durée d'action.
Gestion des sources larvaires	• La reproduction des vecteurs s'effectue dans des gîtes semi-permanents : • Capacité à localiser et à cartographier une très grande proportion des gîtes de reproduction dans un rayon de vol des moustiques autour de la communauté à protéger ; • Bonne sélection des mesures anti-larvaires ; • Participation de la communauté à la réduction et/ou l'élimination des gîtes de reproduction.

Education communautaire

Les mesures anti-vectorielles doivent comporter une importante composante de participation sociale, visant réellement à motiver la protection personnelle et familiale, et comprenant une éducation sanitaire et une mobilisation de la communauté.

Les mesures visant la réduction du contact homme-vecteur impliquent souvent un changement dans les habitudes de la population. Des initiatives éducatives portant sur la bonne utilisation des moustiquaires et autres mesures de protection individuelle, ainsi que sur la nécessité de bons traitements, sont généralement entreprises dans le cadre du programme de lutte.

1.2 Principes de base dans la planification des opérations de lutte contre les vecteurs du paludisme et rôle de l'entomologie

En dépit de l'efficacité des méthodes de lutte actuelles, le coût du paludisme reste élevé dans beaucoup de régions. Malgré une importante augmentation du financement des activités de lutte dans la plupart des pays endémiques (ressources internes et externes), les ressources restent généralement limitées pour atteindre les objectifs fixés par les programmes nationaux.

Les stratégies de lutte doivent être basées sur des études entomologiques et épidémiologiques qui fournissent de bonnes données sur les facteurs déterminants du fardeau de cette maladie à

l'échelle locale. La plupart des pays endémiques restent cependant confrontés à des obstacles majeurs dans la planification et la mise œuvre efficaces des opérations de lutte anti-vectorielles. Les infrastructures, les compétences et les connaissances techniques sont encore inadéquates. De plus, dans beaucoup de régions du monde, les vecteurs développent une résistance aux insecticides.

L'entomologie du paludisme implique l'étude des facteurs biologiques, comportementaux et écologiques qui permettent aux moustiques vecteurs de transmettre les parasites du paludisme d'une personne à une autre. Elle permet de mener des recherches systématiques sur les raisons pour lesquelles les mesures qui sont mises en place peuvent avoir un impact ou pas. L'entomologie est donc un élément essentiel de la planification et de l'amélioration de la stratégie de lutte contre le paludisme.

Quelques questions auxquelles les études entomologiques permettront de répondre sont :

- L'identification des espèces de moustiques-Anophèles présentes dans une localité et la détermination des espèces qui y sont responsables de la transmission du paludisme.
- Le comportement (*par ex.* piqûre, habitudes de repos) et les gîtes de reproduction des espèces vectrices locales : par exemple si les vecteurs se nourrissent également sur des animaux et dans quelle proportion ils se nourrissent à l'intérieur par rapport à l'extérieur.
- Si les interventions mises en place affectent ou non les vecteurs et leur capacité de transmission du paludisme. Les indicateurs mesurés comprennent les variations de la densité de la population vectorielle, des taux d'infection, des niveaux de sensibilité/résistance des vecteurs aux insecticides utilisés et la rémanence des insecticides sur les surfaces traitées et sur les moustiquaires imprégnées.

La réussite de la planification des opérations de lutte antipaludique dépend des résultats de telles études entomologiques. Enfin, la mise en place des opérations de lutte anti-vectorielle doit mettre l'accent sur la rentabilité et la pérennisation. Des efforts doivent être déployés pour un renforcement progressif des capacités locales en matière de planification, de mise en œuvre, de suivi et évaluation.

Types d'enquêtes entomologiques

Il existe quatre principaux types d'enquêtes entomologiques :

- **Enquêtes préliminaires :** Originales, élémentaires et à court terme, elles permettent de recueillir des données de base généralement à des fins de planification d'une intervention anti-vectorielle. L'accent est mis sur l'identification des espèces vectrices, les variations de la densité, le comportement de repos et le comportement de piqûres, les gites larvaires, la longévité, les taux d'infection et la sensibilité aux insecticides.
- **Observations régulières et surveillance des tendances :** Il s'agit d'observations de routine et à long terme (études longitudinales ou opérationnelles de surveillance). Elles sont menées régulièrement (*par ex.* toutes les semaines ou tous les mois) dans le but d'évaluer l'impact des mesures de lutte.

- **Vérifications ponctuelles :** Elles sont menées dans des localités retenues au hasard et autres que les postes de surveillance fixes, dans le but de collecter des données supplémentaires dans des endroits qui ne seraient autrement pas représentés dans une surveillance de routine.
- **Enquêtes ciblées :** Elles sont menées dans des zones nouvelles ou bien dans des zones où la transmission du paludisme est persistante, en vue d'étudier les raisons de cette persistance ou de l'inefficacité des interventions en terme de réduction du fardeau de la maladie.

Unité 2
La biologie des vecteurs du paludisme

Objectifs de l'apprentissage

Il est important de connaître la biologie et le comportement des moustiques *Anophèles,* pour comprendre le mode de transmission du paludisme et pouvoir mettre sur pied de bonnes stratégies de lutte. Cette unité d'apprentissage a pour but d'apporter des connaissances de base dans les domaines suivants :

- **Les parasites, les vecteurs et la transmission du paludisme ;**
- **Le cycle de vie du moustique *Anophèle* ;**
- **Les gites larvaires et les conditions affectant l'émergence des adultes.**

2.1 Parasites, vecteurs et transmission du paludisme

Le paludisme constitue un important problème de santé publique dans la plupart des pays tropicaux. Il est causé par des parasites du genre *Plasmodium* qui sont transmis d'une personne à une autre par la piqûre d'un moustique *Anophèle* femelle infectieux. L'*Anophèle* mâle ne se nourrit que de nectar et de jus de plante et donc ne transmet pas le paludisme.

On compte cinq espèces de *Plasmodium* qui infectent les humains : le *Plasmodium falciparum*, le *Plasmodium vivax*, le *Plasmodium malariae,* le *Plasmodium ovale* et le *Plasmodium knowlesi*. Cette dernière espèce ne se trouve qu'en Asie du Sud-est et infecte principalement les primates non humains.

Il existe environ 480 espèces de moustiques *Anophèles*, dont 80 seulement sont capables de transmettre le paludisme ; 15 de celles-ci sont considérées comme vecteurs majeurs du paludisme. Le moustique prélève le parasite *Plasmodium* quand il prend son repas de sang sur une personne infectée. Une fois dans le moustique, le parasite se multiplie et passe de son estomac, puis dans ses glandes salivaires d'où il est transmis lors du prochain repas à une autre personne.

2.2 Cycle de vie du moustique *Anophèle*

Le cycle de vie d'un moustique comporte quatre stades : œuf, larve, nymphe et adulte (Fig. 1). Au cours de son cycle biologique, le moustique subit deux changements (métamorphoses) : de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte.

Stade d'œuf

- La femelle d'anophèle adulte s'accouple une fois et continue à pondre des œufs durant toute sa vie.
- Les femelles doivent se nourrir de sang tous les 2 à 3 jours. Les œufs ont besoin de sang pour se développer. Les femelles pondent une grappe d'œufs avant leur repas de sang suivant.
- Les œufs sont pondus sur l'eau (flaques, mares, bords de rivière, lac, etc.) en grappes de 50 à 200 œufs.
- Le temps que mettent les œufs à éclore en larves dépend en grande partie de la température:
  - A environ 30°C, les œufs éclosent après une maturation en 2 à 3 jours.
  - Dans les zones tempérées (16°C), cela prend entre 7 et 14 jours.

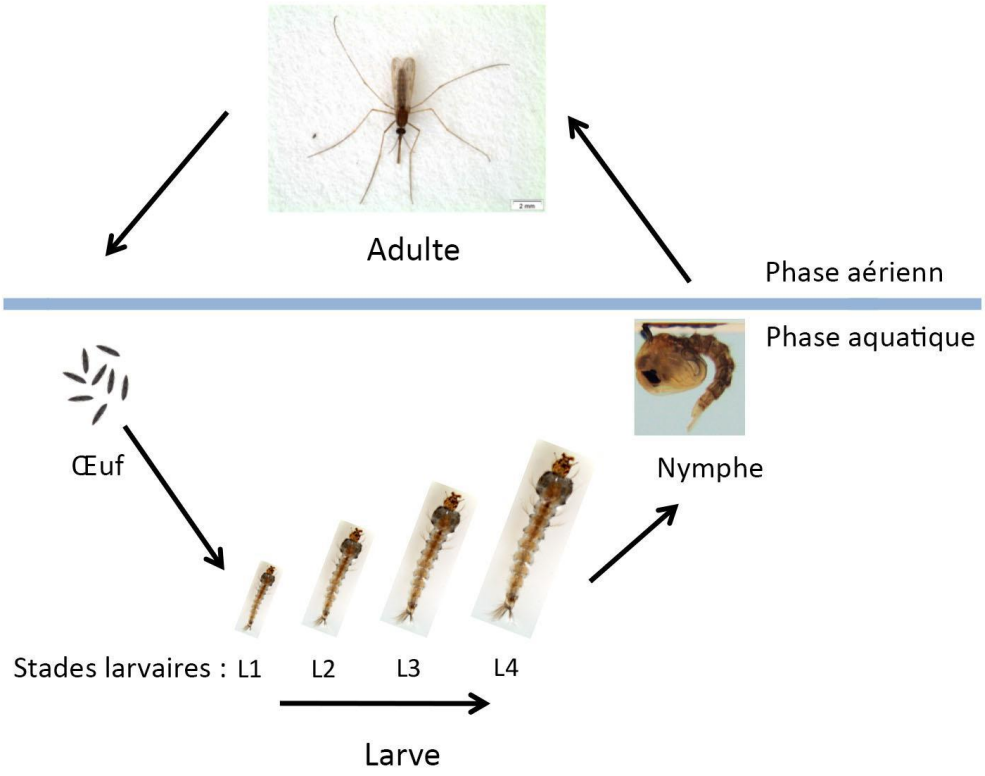


Figure 1. Différents stades du cycle biologique des Anophèles

Stade larvaire

- La larve comporte une tête bien développée munie de brosses buccales qui lui servent pour se nourrir (filtreurs). La larve se nourrit de micro-organismes (*par ex.* algues, bactéries) et de matières organiques présentes dans l'eau où elle se développe.
- La larve d'*Anophèle* n'a pas de siphon respiratoire. Elle se pose parallèlement à la surface de l'eau pour pouvoir respirer.
- Il existe quatre stades de développement appelés stades larvaires (et dénotés de L1 à L4, Fig. 1).
- Le passage du stade larvaire au stade nymphal dure environ 5 à 10 jours dans des températures tropicales normales, selon l'espèce. La température de l'eau affecte le temps de développement, lequel est plus court en eaux plus chaudes.

Stade nymphal

- La nymphe a une forme de virgule et reste à la surface de l'eau.
- Elle est munie de deux trompettes respiratoires au travers desquelles elle respire quand elle est à la surface.
- Aucune alimentation n'a lieu au cours de ce stade mais la nymphe est mobile et réagit aux stimuli.
- C'est le stade de repos (inactif) au cours duquel une importante transformation a lieu entre la vie aquatique et la sortie de l'eau pour une vie aérienne.
- Le stade nymphal dure environ 2 à 5 jours.

Stade adulte

- L'adulte émerge généralement de la nymphe au crépuscule.
- Une fois émergé de la nymphe, le moustique adulte marque un léger temps de repos pour laisser son corps durcir.
- Les moustiques s'accouplent peu après leur émergence (Fig. 2). Les mâles forment de grands essaims, généralement vers le crépuscule, et les femelles s'infiltrent dans les essaims pour s'accoupler.
- Les mâles et les femelles se nourrissent de nectar, source d'énergie.
- Après l'accouplement, le moustique femelle va à la recherche un repas de sang pour que ses œufs puissent se développer. Chez certaines espèces, un seul repas suffit au développement des œufs. Chez d'autres, deux repas sont nécessaires, au moins pour le développement de la première série d'œufs.

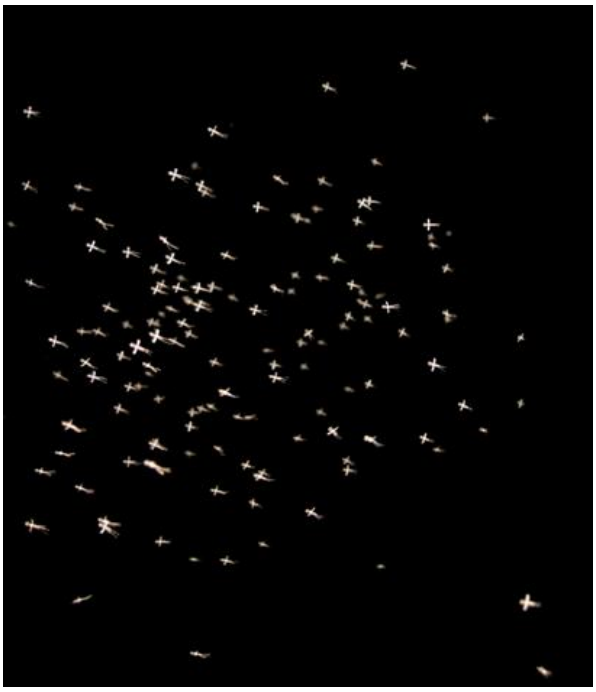


Figure 2. Essaims d'Anophèles mâles au crépuscule pour l'accouplement

(photo : JD Charlwood)

- Le passage de l'œuf à l'adulte d'anophèle peut durer de 7 jours à 31°C à 20 jours à 20°C.

2.3 Gites larvaires et facteurs affectant l'émergence d'adultes à partir d'habitats aquatiques

Le type d'environnement aquatique adapté au développement larvaire du moustique (gite larvaire ou gîte de reproduction) varie grandement d'une espèce à une autre et même au sein de la même espèce. Certaines espèces préfèrent des plans d'eau ombragés, tandis que d'autres préfèrent des habitats ensoleillés. Certaines ont besoin d'une eau non polluée et d'autres vont se développer dans des eaux polluées. Certaines espèces explorent des environnements aquatiques de nature plus permanente (*par ex.* bassins, réservoirs d'eau, canaux d'irrigation), d'autres occupent des flaques temporaires (Fig. 3).

L'*Anophèle* ne se développe généralement pas dans des cours d'eau ou des rivières rapides, les larves n'étant pas adaptées à l'action du courant. Mais les gîtes de reproduction peuvent être divers : marécages, marais, rizières, flaques d'eau, fossés, bassins, ravines, vasques naturelles, trous d'arbre, récipients d'eau et bidons vides. Certaines espèces d'anophèles montrent cependant une préférence pour des conditions particulières.

En Afrique :

- *Anopheles gambiae* préfère des endroits ensoleillés où l'eau s'accumule de façon temporaire, flaques, empreintes de sabots ou de pneus sur les chemins en terre, par exemple.
- *Anopheles funestus* préfère des plans d'eau permanents ou semi-permanents où pousse généralement de la végétation (*par ex.* bords de rivières, marécages et marais).

Aux Amériques :

- Les larves d'*Anopheles darlingi* se trouvent principalement dans les rivages ombragés de rivières et des mares d'eau claire à fond vaseux présentant une végétation émergente ou flottante.

En Asie :

- En zone urbaine, *Anopheles stephensi* se développe dans des habitats construits par l'homme (citernes, puits, gouttières et fontaines) présentant divers types d'eau, notamment des eaux polluées et des eaux saumâtres.

On en sait peu sur les facteurs qui affectent la survie des larves et les mécanismes qui contrôlent l'émergence des adultes. On sait cependant que les précipitations, la température, l'humidité et la saison influencent la survie des larves et l'émergence des adultes.

a. Petite flaque (temporaire), b. Eau accumulée dans des empreintes de pneus le long d'une route (temporaire), c. mares (permanentes), d. Rizière (semi-permanente), e. Réservoirs d'eau et canaux (permanents)

Figure 3. Types de gîtes de reproduction des moustiques

2.4 Déterminants de l'importance médicale chez les adultes

La longévité d'un *Anophèle* adulte varie d'une espèce à une autre et est fonction des facteurs externes, notamment la température, l'humidité et la présence de prédateurs. La durée de vie moyenne d'un anophèle femelle est d'environ 15 jours, mais des longévités allant jusqu'à deux mois ont été observées chez certaines espèces.

Les comportements de piqûre et de repos après le repas de sang (pour permettre le développement des œufs) présentent un grand intérêt épidémiologique.

- Certains moustiques piquent principalement à l'intérieur des habitations (endophages) et d'autres à l'extérieur (exophages).
- Certains moustiques préfèrent piquer les humains (anthropophiles), tandis que d'autres préfèrent se nourrir sur d'autres animaux (zoophiles).
- On qualifie d'endophiles les espèces qui ont tendance à se reposer à l'intérieur des bâtiments au cours de la digestion du sang et du développement des œufs tandis que celles qui se reposent à l'extérieur sont appelées exophiles.
- Les espèces de moustiques peuvent également se différencier de par leur activité trophique pendant la nuit. Certaines atteignent une période d'activité trophique intense aux premières heures de la nuit, d'autres à l'aube. Certains moustiques commencent à piquer au crépuscule, avant même que la nuit tombe. On appelle ce schéma d'activité quotidienne du moustique le cycle d'agressivité.

Unité 3
L'anatomie et l'identification des moustiques

Objectifs de l'apprentissage

A l'issue de cette unité d'apprentissage, l'apprenant devra être à mesure de :

- **Identifier des moustiques Anophèles adultes ;**
- **Différencier les moustiques mâles des moustiques femelles ;**
- **Distinguer l'Anophèle femelle des autres moustiques femelles ;**
- **Distinguer l'œuf et la larve d'un Anophèle de ceux d'autres moustiques.**

Le paludisme humain est transmis exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles*. Ce genre appartient à la sous-famille des Anophelinae (anophèles) au sein de la famille des Culicidae. Il existe une autre sous-famille appelée Culicinae (culicidés) qui regroupe deux genres de grande importance médicale : *Aedes* (*par ex. Aedes aegypti*, vecteur de la dengue et de la fièvre jaune) et *Culex* (*par ex. Culex quinquefasciatus*, vecteur de la filariose lymphatique). A l'exception de la nymphe, il est possible de distinguer aisément les anophèles des culicinés à tous les stades du cycle de vie du moustique.

3.1 Comment distinguer les œufs d'anophèles de ceux des autres culicidés

- Les œufs d'anophèles comportent des flotteurs (Fig. 4) sur le côté et les œufs flottent séparément à la surface de l'eau.
- Les œufs de culicidés ne comportent pas de flotteur. Les œufs de culex sont pondus sur une structure qui flotte à la surface de l'eau. Les œufs d'aedes sont pondus individuellement sur une surface solide et pas à la surface de l'eau.

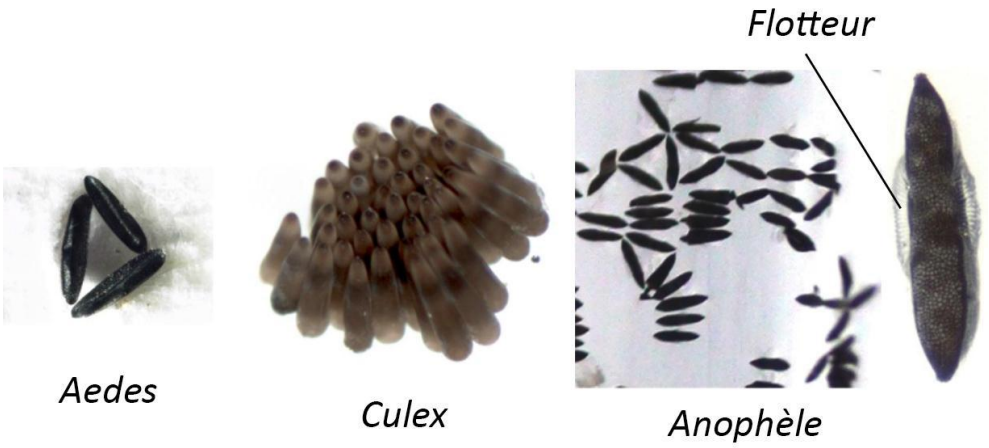


Figure 4. Exemples d'œufs d'*Aedes*, de *Culex* et d'*Anophèle*

3.2 Comment distinguer les larves d'anophèles de celles des autres culicidés

La larve de moustique comporte une tête, un thorax et un abdomen (Fig. 5). Au cours de son développement, la larve passe par quatre stades (de L1 à L4) et sa taille augmente à chaque stade (Fig. 1).

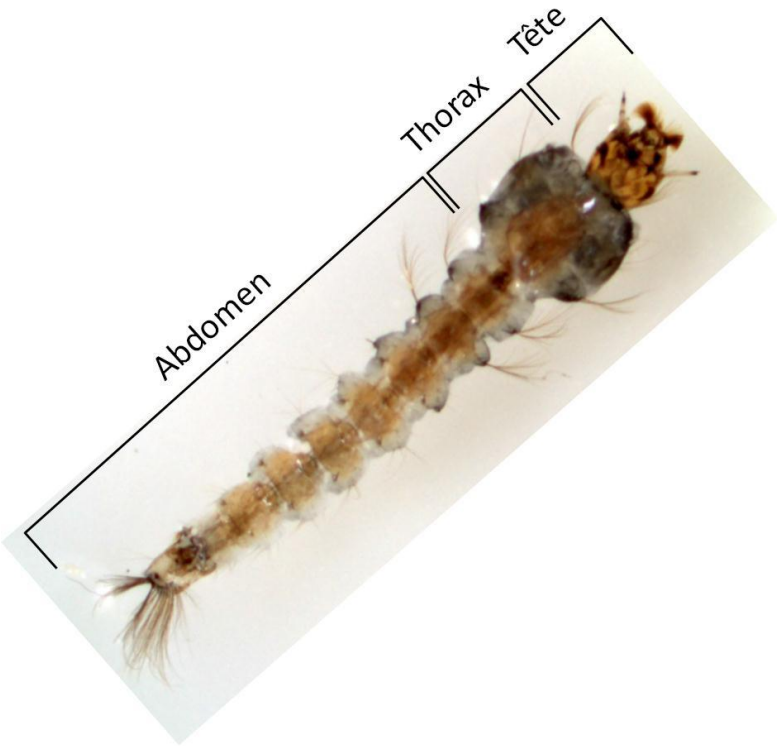


Figure 5. Anatomie de la larve d'*Anophèle*

Deux principales caractéristiques permettent de distinguer les larves d'anophèles des larves de culicidés (Fig. 6) :

- Les larves de culicinés (*Culex* et *Aedes*) ont des siphons respiratoires qui leur permettent de se suspendre à la surface de l'eau.
- Les larves d'anophèles n'ont pas de siphons et elles se reposent parallèlement à la surface de l'eau. Etant dépourvues d'un siphon, elles respirent au travers de petits orifices appelés spiracles.

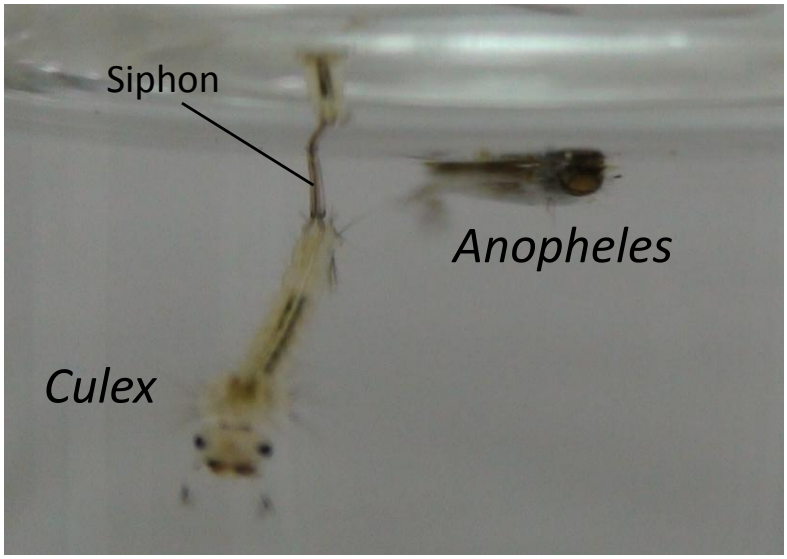


Figure 6. Différences entre les larves d'Anophèles et les larves de culicinés

3.3 La nymphe

Les nymphes de moustiques sont en forme de virgule (Fig. 7). Elles se reposent juste à la surface de l'eau et plongent rapidement quand on les perturbe. Il est très difficile de distinguer les nymphes d'anophèles des nymphes de culicinés, leurs différences étant plus subtiles.

Figure 7. Nymphe d'anophèle

3.4 Comment distinguer les moustiques anophèles des autres culicidés

Le corps du moustique adulte présente une tête, un thorax et un abdomen (Fig. 8). La tête comporte deux grands yeux composés, deux antennes, deux palpes maxillaires et une trompe, qui est adaptée pour percer et sucer. Au niveau du thorax, il y a trois paires de pattes (postérieures, moyennes et antérieures), une paire d'ailes et une paire d'haltères (ailes vestigiales modifiées). L'abdomen comporte 10 segments et les deux derniers sont modifies pour former les organes génitaux (mâles ou femelles).

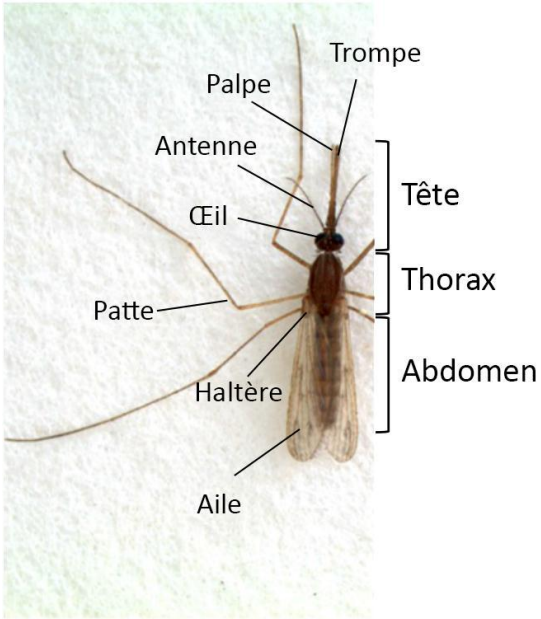


Figure 8. Anatomie d'un moustique adulte

Deux principales caractéristiques permettent de distinguer les anophèles adultes des culicinés adultes : les palpes maxillaires (Fig. 9) et la position de repos (Fig. 10).

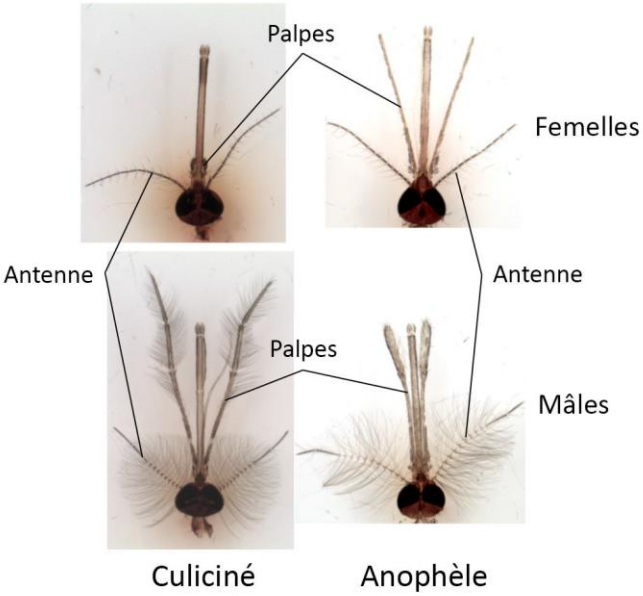


Figure 9. Différences entre les anophèles et les culicinés au niveau de la tête des mâles et des femelles

- Les femelles du genre *Anopheles* présentent des palpes maxillaires aussi longes que la trompe ; alors que les palpes des femelles des culicinés sont bien plus courtes que leur trompe.
- Le bout des palpes d'anophèles mâles est arrondi, ce qui n'est pas le cas pour les culicinés.
- Les moustiques anophèles et culicinés ont en commun le dimorphisme sexuel de l'antenne. Les mâles présentent une antenne épaisse (plumeuse) tandis que celle des femelles est simple (pileuse) (Fig. 9).
- Les anophèles adultes ont tendance à se reposer suivant un angle de 50^0 à 90^0 par rapport à la surface. Les culicinés ont tendance à se reposer parallèlement à la surface (Fig. 10).

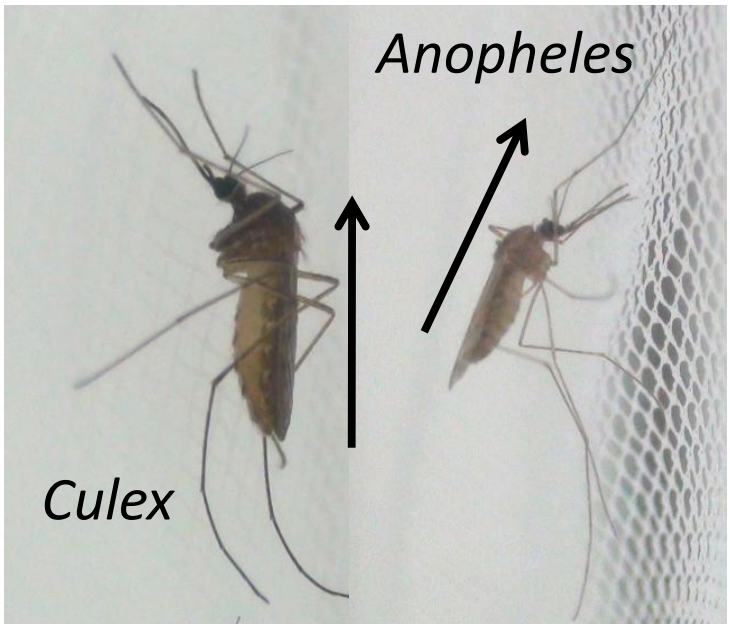


Figure 10. Position de repos des moustiques culicinés et des anophèles adultes

3.5 Techniques d'identification des espèces de moustiques

En dehors des différences présentées ci-dessus entre les anophèles et les culicinés, il est également important de souligner les différentes entre les espèces d'anophèles. Plusieurs techniques permettent d'identifier les espèces d'anophèles, notamment :

- **Techniques morphologiques : Elles** mettent en jeu des clés taxonomiques. Certains des principaux caractères morphologiques utilisés dans l'identification des moustiques sont au niveau des palpes, de la trompe, des pattes, des ailes et du thorax. Il existe plusieurs clés d'identification pour l'identification morphologique des espèces vectrices du paludisme et ces clés peuvent varier en fonction des régions et des espèces vectrices présentes.
- **Cytotaxonomie** : Ces méthodes ont recours aux différences observées au niveau des chromosomes des espèces. . Ces techniques ne peuvent être appliquées qu'à certains stades du cycle de vie du moustique ou à un sexe, quand les chromosomes polytènes (« géants ») peuvent être observés au microscope.
- **Techniques moléculaires :** Ces méthodes consistent en l'analyse de p des différences au niveau de l'ADN des espèces. L'ADN restant inchangée au cours du cycle de vie du moustique, ces méthodes peuvent être appliquées à tous les stades de vie (immature ou adulte).

Les méthodes cytotaxonomiques et moléculaires d'identification sont souvent appliquées pour identifier des groupes d'espèces ne présentant pas de différences morphologiques entre elles ; notamment dans le cas des complexes d'espèces jumelles (voir Unité 4). Ces méthodes ne seront pas démontrées dans ce cours.

Unité 4
La diversité des vecteurs du paludisme

Objectifs de l'apprentissage

Il est important de connaître les vecteurs locaux du paludisme pour comprendre la transmission et mettre au point des stratégies de lutte efficaces. Cette unité de d'apprentissage permettra de comprendre :

- **Que la transmission du paludisme est souvent assurée par plusieurs espèces vectrices qui coexistent dans la même zone ou région ;**
- **Que les espèces vectrices présentent des comportements différents, ce qui peut avoir des implications sur la transmission du paludisme et les stratégies de lutte.**

Environ 480 espèces d'anophèles sont reconnues dans le monde, mais seules environ 80 d'entre elles sont considérées comme vectrices du paludisme. A l'exception de l'Antarctique, les vecteurs du paludisme sont présents sur tous les continents du monde. Qui plus est, plusieurs espèces vectrices peuvent se trouver dans la même zone et en même temps (espèces sympatriques).

Du fait des différences écologiques et comportementales, les espèces sympatriques peuvent former des systèmes vectoriels complexes. Par exemple, quand une espèce vectrice qui préfère des gîtes de reproduction semi-permanents se trouve dans la même zone qu'une autre espèce qui préfère des flaques d'eau temporaires, cela présente des difficultés accrues pour une lutte anti-vectorielle larvaire. De même, la sympatrie d'une espèce endophage avec une espèce exophage crée des difficultés additionnelles dans la lutte anti-vectorielle à l'intérieur des habitations (Moustiquaires à longue durée d'action, par exemple).

Une meilleure connaissance des vecteurs ciblés est donc le gage de succès de toute stratégie de lutte anti-vectorielle.

4.1 Complexes d'espèces jumelles

Les Plusieurs espèces d'anophèles présentent les mêmes traits morphologiques mais des différences génétiques. C'est ce qu'on appelle des espèces jumelles ou cryptiques qui forment un « complexe » ou « groupe ». En dépit de similitudes morphologiques, les espèces jumelles sont isolées du point de vue reproductif. Ceci entraîne l'accumulation de différences génétiques qui mènent souvent à des différences bioécologiques et comportementales. Ces différences peuvent entraîner des variations d'importance médicale dans les espèces jumelles d'un complexe et peuvent également avoir d'importantes implications dans la lutte anti-vectorielle.

La composition des espèces d'anophèles varie en fonction des régions du monde et les vecteurs responsables de la transmission du paludisme varient également d'une région à une autre. On trouvera dans les sections suivantes une brève description de certains des principaux vecteurs du paludisme en Afrique, aux Amériques et en Asie. La description des espèces est basée sur les ouvrages de Service et Townson (2002), Manguin *et al.* (2008), Hay *et al.* (2010) et Sinka *et al.* (2010a,b). Les participants sont encouragés à consulter ces ouvrages pour s'informer plus en détail sur la diversité des vecteurs du paludisme dans les différentes régions du monde.

4.2 Les vecteurs du paludisme aux Amériques

Les principales espèces responsables de la transmission du paludisme aux Amériques sont les suivantes :

Anopheles albimanus

Cette espèce est un important vecteur du paludisme au Mexique, en Amérique centrale et dans la partie nord-ouest de l'Amérique du sud (Colombie, Equateur, Pérou et Venezuela). Les gites larvaires sont généralement des collections d'eau ouvertes, ensoleillées, naturelles ou artificielles, d'eau douce ou saumâtre et présentant une végétation flottante ou émergente. Cette espèce pique à l'intérieur et à l'extérieur des habitations et est principalement exophile. Elle a tendance à la zoophilie, mais cela dépend étroitement de l'emplacement géographique et de la disponibilité d'hôtes.

Complexe Anopheles albitarsis

Le complexe *Anopheles albitarsis* compte quatre espèces : *Anopheles albitarsis* A et B, *Anopheles marajoara* et *Anopheles deaneorum*. Les larves se développent dans des mares, des rizières et des marécages ensoleillés à grande surface d'eau douce et claire et où poussent des algues filamenteuses. Les adultes sont exophiles et piquent tout aussi aisément les hommes que les animaux domestiques et tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations. Ce complexe se trouve dans toute la partie nord et centrale de l'Amérique du sud.

Anopheles darlingi

Bien que cette espèce soit répandue, c'est le principal vecteur du paludisme dans la région amazonienne. Sa distribution va du nord du continent (Colombie, Guyane française, Guyana, Suriname, Venezuela et nord du Pérou) à l'est du Brésil et au sud jusqu'au Paraguay et au nord de l'Argentine. C'est un moustique fluvial adapté aux zones rurales et forestières. Les gîtes de reproduction sont généralement les bords ombragés de rivières à courant lent, à eau claire et à végétation submergée ; mais on peut le trouver également dans des mares d'eau douce, des marécages, des lagunes et des rizières. *Anopheles darlingi* a tendance à se reposer à l'intérieur des habitations et son degré d'endophagie et d'anthropophilie est très variable. Cette variation a parfois été associée à des changements comportementaux de la population humaine.

Complexe Anopheles nuneztovari

Ce complexe comprend deux ou peut-être trois espèces jumelles (A et B/C) différenciées par des critères chromosomiques, mais le statut taxonomique de ce complexe d'espèces reste à être entièrement clarifié. Les espèces de ce complexe sont présentes le long des parties nord et centrales de l'Amérique du sud et absentes dans les régions côtières et ouest du continent. Les gites larvaires sont généralement des plans d'eau trouble ensoleillés, des empreintes de pneus et de sabots et de petites flaques de nature temporaire ou semi-permanente. Les adultes sont principalement exophiles, exophages et zoophiles, mais ils peuvent piquer les hommes à l'extérieur. Il existe une différence entre le cycle trophique des espèces jumelles, l'espèce A piquant plus tôt dans la soirée (principalement entre 18 h 00 et 20 h 00) et les espèces B/C plus tard au milieu de la nuit (principalement entre 22 h 00 et 2 h 00).

Complexe Anopheles pseudopunctipennis

Ce complexe comprend au moins deux espèces jumelles, largement réparties du sud-Est des Etats-Unis à l'Amérique centrale, et de la partie du continent sud-américain jusqu'au nord de l'Argentine. Elles peuvent survivre en altitude (jusqu'à 3 000 m). Les larves se trouvent principalement sur les rives ensoleillées de rivières peu profondes, dans les plans d'eau douce où d'abondantes algues filamenteuses assurent leur protection. Ces espèces peuvent être d'importants vecteurs au cours de la saison sèche, quand le niveau des rivières est bas et que l'eau s'accumule en petites flaques. Les adultes présentent un comportement trophique opportuniste marqué et se nourrissent tant sur les hommes que sur les animaux et à l'intérieur comme à l'extérieur. On les considère principalement comme exophiles mais plusieurs études suggèrent qu'une certaine proportion des moustiques de cette espèce se repose à l'intérieur après s'être nourris.

4.3 Les vecteurs du paludisme en Afrique

En Afrique, les principaux vecteurs du paludisme appartiennent au complexe *Anopheles gambiae* et au groupe *Anopheles funestus*. Etant donné la grande importance du paludisme sur le continent africain, ce sont probablement les espèces de moustiques les plus étudiées au monde.

Complexe Anopheles gambiae

Ce complexe comprend 7 espèces jumelles qui peuvent être groupées en espèces d'eau douce : *Anopheles gambiae* sensu stricto, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles bwambae* et *Anopheles quadriannulatus* A et B et en espèces d'eau saumâtre : *Anopheles melas* et *Anopheles merus*.

- ***Anopheles gambiae* s.s. et *Anopheles arabiensis***

  Anopheles gambiae s.s. et *Anopheles arabiensis* sont les principaux vecteurs du paludisme du complexe et sont largement distribués géographiquement. *Anopheles gambiae* s.s. est prédominant dans les zones de savane et de forêt humides tandis que *An. arabiensis* préfère des environnements plus arides. Les deux espèces colonisent des gîtes de reproduction temporaires, généralement petits, peu profonds, ensoleillés et sans végétation. Les deux espèces occupent souvent le même gite larvaire. *Anopheles gambiae* s.s. se nourrit

principalement sur l'homme (anthropophile). *An. arabiensis* est généralement davantage zoophile. Ces espèces présentent cependant d'importantes différences dans leurs préférences en matière d'hôtes et leur comportement trophique sur tout le continent africain. A quelques exceptions près, *Anopheles gambiae* s.s. est généralement endophage et endophile ; tendis qu'*Anopheles arabiensis* montrent une plus grande variabilité de comportements.

- ***Anopheles quadriannulatus* A et B**

  Anopheles quadriannulatus A est strictement zoophile ; il est donc le seul membre du complexe *An. gambiae* à ne pas transmettre le paludisme. Les sites de ponte sont semblables à ceux des autres espèces d'eau douce du complexe. En 1998, une nouvelle espèce a été décrite à partir d'échantillons prélevés en Ethiopie et appelée à titre provisoire *Anopheles quadriannulatus* espèce B. On en sait très peu sur sa biologie.

- ***Anopheles bwambae***

  Cette espèce se développe dans l'eau venant des sources hydrothermales à des températures de 33 à 36°C et présentant un pH légèrement plus élevé que les sites d'eau douce colonisés par les larves d'*An. gambiae s.s.* La distribution d'*Anopheles bwambae* est restreinte à la forêt de Semliki en Ouganda. Cette espèce s'y trouve en permanence et à de fortes densités dans la forêt où elle pique les hommes principalement à l'extérieur. Bien qu'elle soit capable de transmettre le paludisme, ce n'est pas un vecteur très majeur du fait de sa distribution limitée.

- ***Anopheles melas* et *Anopheles merus***

  Ce sont deux espèces du complexe adaptées à l'eau saumâtre. Elles occupent toutes deux des habitats côtiers cernés de palétuviers (*par ex.* estuaires, lagunes et marécages). Elles diffèrent cependant dans leur distribution géographique. On trouve *Anopheles melas* sur la côte ouest de l'Afrique tandis qu'*An. merus* se trouve exclusivement sur la côte Est. Ces deux espèces sont considérées comme des vecteurs secondaires du paludisme.

Groupe Anopheles funestus

Le groupe *Anopheles funestus* comprend neuf espèces jumelles étroitement liées. Parmi celles-ci, seule l'espèce nominale, *Anopheles funestus* s.s., est un vecteur du paludisme dans toute l'Afrique. Aucuns des autres membres du groupe n'est vecteur du paludisme ; il s'agit de : *Anopheles rivulorum* (en Afrique occidentale et orientale), *Anopheles leesoni* (en Afrique occidentale et orientale), *Anopheles confusus* (en Afrique de l'Est), *Anopheles parensis* (en Afrique de l'Est), *Anopheles vaneedeni* (au nord de l'Afrique du sud), *Anopheles fuscivenosus* (en Zimbabwe), *Anopheles aruni* (au Zanzibar) et *Anopheles brucei* (au Nigéria). Ces espèces sont principalement zoophiles.

- ***Anopheles funestus s.s.***

  Il est considéré comme le deuxième vecteur du paludisme en Afrique, après *An. gambiae* s.s. Comme *An. gambiae* s.s. , *An. funestus* s.s. est largement distribuée sur tout le continent africain au sud du désert du Sahara. *Anopheles funestus* s.s. se développe généralement dans

des plans d'eau relativement étendus et de nature permanente et semi-permanente munis de végétation (*par ex.* marécages, mares, bords de lacs). C'est une espèce hautement anthropophile qui pique surtout à l'intérieur des habitations (endophage).

4.4 Les vecteurs du paludisme en Asie

Les principaux vecteurs du paludisme dans la région de l'Asie du sud-sont :

Complexe Anopheles culicifacies

Le complexe *An. culicifacies* est largement distribué sur tout le continent asiatique, depuis l'Ethiopie et la côte sud de la péninsule d'Arabie à l'Est, au travers du sous-continent indien et jusqu'à la Chine du sud, Vietnam, Laos, Cambodge, Thaïlande et Myanmar. Cinq espèces identifiées à partir des critères chromosomiques (A, B, C, D et E) ont été décrites dans ce complexe. Parmi celles-ci, l'espèce E est considérée comme étant le vecteur majeur du paludisme du complexe, notamment en Inde. L'espèce B n'est pas vectrice. Les larves occupent divers gîtes de reproduction : eau propre ou polluée, gîtes ensoleillés ou ombragés. L'espèce E est hautement endophile et anthropophile, tandis que les autres espèces sont davantage zoophiles, surtout l'espèce B. Toutes ces espèces piquent tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations.

Complexe Anopheles dirus

Ce complexe comprend sept espèces jumelles : *Anopheles dirus*, *Anopheles cracens*, *Anopheles scanloni*, *Anopheles baimaii*, *Anopheles elegans*, *Anopheles nemophilous* et *Anopheles takasagoensis*. A l'exception d'*An. elegans* (que l'on trouve dans les forêts montagneuses du sud-ouest de l'Inde), d'*An. baimaii* (du nord-ouest de l'Inde au sud de Myanmar et à l'ouest de la Thaïlande) et d'*An. takasagoensis* (en Taïwan), les autres espèces de ce complexe sont distribuées sur tout le territoire des péninsules indochinoise et malaisienne. Les larves se développent généralement dans des petites flaques et empreintes de sabots temporaires et ombragées ou dans les forêts ou en bord de forêt. Le complexe comprend à la fois d'importants vecteurs du paludisme que l'on trouve dans les zones de forêt tropicale humide, les forêts cultivées et les lisières de forêt et des espèces de moindre importance dans la transmission du paludisme. Principalement exophages et anthropophiles, *Anopheles dirus* et *An. baimaii* sont les principaux vecteurs du paludisme en zone de forêt . Ils ont tendance à se reposer à l'extérieur après s'être nourris. *Anopheles nemophilous* et *An. takasagoensis* sont des espèces zoophiles et donc considérées comme n'étant pas vectrices.

Groupe Anopheles maculatus

Le groupe *An. maculatus* comprend 8 espèces jumelles, dont 6 forment deux sous-groupes : le sous-groupe *maculatus* (*Anopheles dispar*, *Anopheles greeni*, *Anopheles dravidicus* et *Anopheles maculatus*) et le sous-groupe *sawadwongporni* (*Anopheles notanandai* et *Anopheles sawadwongporni*). Deux espèces additionnelles ne sont pas affectées à un sous-groupe : *Anopheles pseudowillmori* et *Anopheles willmori*. Les membres du groupe *An. maculatus* sont répartis dans toute l'Asie, de l'Inde à l'Indonésie et aux Philippines. La définition précise du rôle

de chacune des espèces dans la transmission du paludisme reste énigmatique à cause des problèmes d'identification.

- ***Anopheles maculatus***

  C'est l'espèce nominale du groupe ; présente la plus grande distribution, allant de l'ouest de l'Afghanistan et du Pakistan au sud de la Chine et Taïwan jusqu'aux péninsules indochinoise et malaisienne et aux îles indonésiennes (Sumatra et Java). Elle est considérée comme un vecteur majeur du paludisme dans l'Est de l'Inde, le sud de la Thaïlande, la Malaisie et Java. Cette espèce se trouve principalement dans des zones montagneuses ou près de celles-ci, où elle occupe divers gîtes larvaires, notamment les eaux d'infiltration, les fossés, rizières, les mares, les bords de rivières, les marécages et les lacs. Les adultes piquent les animaux et les hommes, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations et se reposent à l'extérieur après s'être nourris.

Complexe Anopheles minimus

Ce complexe comporte au moins trois espèces jumelles : *Anopheles minimus* espèce A, *Anopheles harrisoni* (espèce C) et *Anopheles minimus* espèce E. La distribution de ces espèces s'étend du Nord-Ouest de l'Inde à l'Est vers le Bangladesh, le Vietnam, le Laos, le Cambodge, la Thaïlande, Myanmar et le sud de la Chine et au Sud vers la Malaisie et les îles indonésiennes. *An. minimus* et *An. harrisoni* sont responsables de la transmission du paludisme dans les régions montagneuses à des altitudes situées entre 200 et 1 000 m. On les trouve dans les zones forestières où les larves se développent dans des cours d'eau claires, à courant lent, à bords herbeux ; mais elles peuvent également occuper des réservoirs d'eau, des rizières et des emprunts. *Anopheles minimus* est considéré comme étant anthropophile, endophage et endophile, mais il présente importante variabilité dans son comportement trophique. Comparée à son espèce jumelle, *An. harrisoni* semble davantage zoophile et exophage.

Unité 5
La collecte de moustiques aux stades larvaires

Objectifs de l'apprentissage

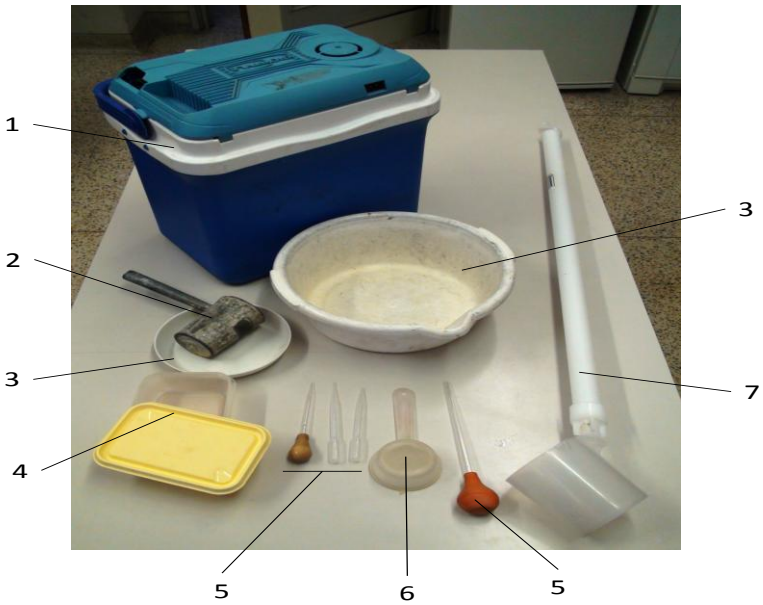
Cette unité de d'apprentissage explique dans ses grandes lignes comment :

- **Récolter des échantillons de larves et de nymphes de moustiques vecteurs dans leurs habitats naturels.**

Les moustiques vecteurs ont diverses préférences en matière de gîte larvaire. Les gîtes sont diversifiés ; on distingue des mares, des lacs, des marécages, des marais, des rizières, des petites flaques d'eau de pluie, des empreintes laissées par des sabots d'animaux ou des pneus de véhicules, des aisselles de plante et des abords de cours d'eau. Il est important de connaître les préférences des vecteurs du paludisme locaux en matière d'habitat pour pouvoir mettre en place des mesures de lutte efficaces. La collecte de larves de moustiques est une activité primordiale dans la surveillance des vecteurs. Les informations obtenues à partir d'échantillons larvaires regroupent :

- la détermination de l'espèce vectrice présente dans la zone d'étude ;
- l'identification des gîtes de reproduction productifs préférés par chaque espèce ;
- la détermination de la distribution géographique des vecteurs ;
- l'évaluation de l'impact des mesures anti-larvaires sur la densité larvaire ;
- la récolte des échantillons pour la production d'adultes à l'insectarium ;

L'équipement nécessaire pour la collecte d'échantillons larvaires est fonction de la méthode utilisée. Le matériel le plus souvent employé est le suivant (Fig. 11) : godets, filets (nappe pour une concentration plus importante de larves), quadrants, plateaux, tamis et louches. Pour la collecte dans les petits plans d'eau : il faut des pipettes et des récipients fermés (pour y mettre les échantillons). Le matériel de reportage est le suivant : feutres résistants à l'eau, ruban adhésifs, formulaires d'annotation (voir section 5.2). Un système de localisation GPS, un thermomètre à eau et un pH-mètre sont également utiles pour localiser et caractériser les gîtes. Les personnes chargées de la collecte doivent porter des bottes et des gants de protection.



1. glacière, 2. louche, 3. plateaux, 4. récipient fermé, 5. pipettes, 6. tamis, 7. godet.

Figure 11. Equipement nécessaire pour la collecte de larves

5.1 Méthodes d'échantillonnage

Il existe plusieurs méthodes d'échantillonnage des larves, chacune dépendant de la nature et du type du gîte tel que décrit dans les paragraphes suivants.

Le captureur de larves doit approcher lentement le gîte, car toute perturbation est susceptible de faire plonger les larves et les nymphes au fond du gîte et de les rendre inaccessibles. Le captureur de larves doit se positionner face au soleil, de sorte que son ombre ne balaie pas la surface du gîte. Si les larves et les nymphes plongent au fond du gîte, il est nécessaire de rester immobile jusqu'à ce qu'elles remontent à la surface.

Récolte au godet

- Cette méthode est normalement utilisée pour collecter des échantillons dans des plans d'eau relativement étendus tels que les marécages, les fossés, les rivières et les rizières par exemple (Fig. 12).
- Elle consiste à abaisser le godet doucement suivant un angle d'environ 45^0 pour minimiser la perturbation, puis soit ratisser la surface de l'eau ou alors abaisser suffisamment le godet pour que l'eau et les larves y pénètrent. Il faut veiller à ne pas éclabousser quand on sort le godet.
- Les larves sont recueillies à l'aide d'une pipette et transférées dans un flacon bien étiqueté.
- Quand une végétation émergente pousse dans le gîte, le captureur doit brouiller l'eau pour éloigner les larves vers le fond, puis retirer un peu de la végétation pour dégager

une zone de prélèvement et attendre quelques minutes avant de reprendre la collecte comme indiqué plus haut.

- Il faut enregistrer le nombre de fois que l'on plonge le godet dans chaque gîte pour pouvoir calculer la densité larvaire. Il faut également prendre note du temps passé à la collecte.

Figure 12. Collecte des larves à l'aide d'un godet

Récolte au filet

- Cette méthode consiste à utiliser un filet à mailles fines monté sur un manche, un flacon ou tube en plastique attaché à l'extrémité du filet. Elle est généralement utilisée pour recueillir des larves et des nymphes dans de grands plans d'eau comme des mares et petits lacs.
- Le filet est tenu suivant un angle d'environ 45° par rapport à la surface de l'eau, puis actionné pour balayer la surface de l'eau. Les larves et les nymphes sont recueillies dans le flacon en plastique qui se trouve au bout du filet.

Récolte à la pipette

- Cette méthode est utilisée pour recueillir des larves et des nymphes dans des gîtes de petite taille, notamment les flaques, les empreintes de sabots d'animaux, les récipients, les aisselles de plantes et les trous d'arbres par exemple (Fig.13).

Figure 13. Récolte des larves par pipetage

5.2 Enregistrement des informations de collectes

Il faut utiliser dans la mesure du possible un système de localisation GPS ou autres moyens manuels (*par ex.* dessins) pour localiser et numéroter les gîtes larvaires échantillonnés. Il faut impérativement enregistrer les caractéristiques du gîte, notamment :

- Emplacement géographique (coordonnées de GPS, nom de la localité),
- Type de gîte (permanent, semi-permanent, temporaire),
- Origine de l'eau (*par ex.* pluie, rivière, lagune, artificielle),
- Nature de la collection d'eau (*par ex.* flaque, rizière, fossé),
- Exposition aux rayons du soleil (ensoleillé, ombragé),
- Présence de la végétation (émergente, submergée, flottante),
- Caractéristiques de l'eau (*par ex.* claire, saumâtre, polluée, sombre, température, pH).

Les données enregistrées doivent également inclure le nombre de prélèvements, le temps passé et la date. Tous les flacons contenant des larves récoltées dans chaque gîte doivent être étiquetés avec le numéro du gîte porté dans le carnet. Un exemple de fiche de collecte de données larvaires se trouve en Annexe II.

5.3 Transport de larves vivantes

Tous les spécimens récoltés dans un gîte donné doivent être conservés dans un flacon étiqueté au crayon. On met l'étiquette dans le flacon. Les informations essentielles portées sur l'étiquette sont les suivantes: date, lieu, initiales du préleveur, numéro d'échantillon ; ces informations doivent correspondre à celles portées sur le formulaire d'enregistrement des données. L'extérieur du flacon peut également être étiqueté au feutre permanent.

- Pour éviter de trop les secouer ou de les exposer à une chaleur extrême, on transporte les flacons dans un récipient adapté, glacière avec blocs réfrigérants par exemple.
- Si les larves sont transportées sur de longues distances, il ne faut pas couvrir le récipient. S'il est couvert, ouvrez-le de temps en temps (*par ex.* toutes les 2 heures). il faut s'assurer qu'il y a un espace de 1 à 2 cm dans le flacon pour que les larves et les nymphes puissent respirer.
- On peut aussi emporter de l'eau du gîte dans un autre récipient, surtout si les larves doivent être soumises à des tests de susceptibilité (et donc se développer jusqu'à l'émergence en adultes).

5.4 Conservation des échantillons

Au laboratoire, les larves sont identifiées, comptées et conservées en vue d'une analyse ultérieure. Les larves peuvent être affaiblies en les exposant à la chaleur (en les mettant dans de l'eau chaude de 50°C à 70°C) ou en les noyant dans de l'éthanol absolu. Elles sont ensuite conservées dans de l'éthanol à 70-80 % ou de l'éthanol à 80 % + de la glycérine à 2 %. Si on utilise de l'eau chaude, il retirer l'eau du flacon en veillant à ce que les larves mortes restent au fond ; Puis ajouter de l'éthanol dans le flacon avant de le fermer.

5.5 Estimation des paramètres larvaires

Les études sur les larves fournissent diverses informations sur les aspects bioécologiques des espèces de moustiques. Elles servent également à évaluer l'impact de mesures anti vectorielles en comparant les densités larvaires et l'occupation du gîtes de reproduction avant et après la mise en place de l'intervention.

L'estimation des densités larvaires est complexe car elle exige la standardisation des travaux d'échantillonnage. En effet, il faut procéder au même nombre de récoltes à chaque gîte et utiliser des godets de même taille, ce qui peut être difficile sur le terrain, les gîte variant énormément en taille et en forme. Pour surmonter ces contraintes, il est nécessaire de mettre au point des techniques d'échantillonnage plus élaborées pour estimer les densités larvaires. Quand les bonnes conditions d'échantillonnage sont remplies, un simple index à utiliser pour calculer la densité larvaire est l'index culicidogène (BI)[3] :

$$BI = TLP \div ND \times BP$$

Dans lequel :

TLP = nombre total de larves et de nymphes récoltées
ND = nombre total de récoltes
BP = nombre de gîtes prospectés

[3] Belkin J.N. (1954). Simple larval and adult mosquito indexes for routine mosquito control operations. *Mosquito News* 14:127-131.

D'autres paramètres sont disponibles qui permettent d'estimer l'occupation gîtes par les moustiques. Trois exemples sont donnés ci-dessous [4]:

Index culicidogène général (GBI)

Cet index donne une mesure de la proportion des plans d'eau colonisés par les moustiques dans une localité donnée. On le calcule en divisant le nombre de gîtes productifs en larves et nymphes par le nombre total de gîtes prospectés.

Index culicidogène absolu (ABI)

C'est la proportion relative de sites de gîtes colonisés par une espèce vectrice donnée dans une localité donnée. Pour calculer cet index, les larves doivent être identifiées au niveau de l'espèce. On l'obtient en divisant le nombre de gîtes productifs pour cette espèce par le nombre total de gîtes prospectés.

Index culicidogène relative (RBI)

Ce paramétrer indique l'abondance des gîtes d'une espèce donnée par rapport au nombre de gîtes productifs pour tous les moustiques. On le calcule en divisant le nombre de gîtes colonisés par cette espèce par le nombre total de gîtes productifs pour tous les moustiques.

[4] Ribeiro H. *et al.* (1980). *Os mosquitos de cabo verde (Diptera: Culicidae), sistemática, distribuição, bioecologia* e *importância médica.* Junta de Investigações Científicas do Ultramar, Lisboa. 141p.

Unité 6
La collecte de moustiques au stade adulte

Objectifs de l'apprentissage

On trouvera dans cette unité d'apprentissage des informations de base sur :

- **Les méthodes utilisées pour capturer les moustiques adultes.**

Les populations de moustiques dans toute localité se composent de différentes espèces présentant différents comportements et états physiologiques (*par ex.* nourries à satiété, gravides et récemment émergées). Différents comportements peuvent également être observés en fonction de l'état physiologique du moustique vecteur, notamment la recherche d'hôtes, le repos pour la maturation des œufs et la sortie d'habitation à la recherche d'un gîte de ponte (site d'oviposition). Diverses méthodes d'échantillonnage ont été mises au point pour tenir compte de ces différences au sein d'une même population de moustiques.

6.1 Méthodes de capture de moustiques adultes

Avant de procéder à une capture sur le terrain, il faut s'assurer qu'on dispose de tout le matériel nécessaire. Une démonstration sera faite en classe sur la façon de préparer et d'utiliser correctement le matériel nécessaire pour chaque méthode de capture. Les participants auront l'occasion de s'y exercer avant la formation pratique.

Capture direct de moustiques agressif sur volontaire (Human landing catches : HLC)

Cette méthode standardise une procédure pour l'évaluation des interactions entre le vecteur et l'hôte humain. Le nombre de vecteurs qui piquent les hommes est un important paramètre dans l'estimation du niveau de la transmission du paludisme, car il permet de répondre aux questions suivantes :

- Quels anophèles piquent les humains ?
- Quelles espèces sont vectrices du paludisme ?
- Combien de fois une personne est-elle piquée par un vecteur ?
- Quel est le comportement trophique pendant la nuit ?
- Les vecteurs piquent-ils à l'intérieur ou à l'extérieur des habitations ?

Matériel de base (Fig. 14) : Aspirateurs buccaux/mécaniques, gobelets en papier non paraffiné fermés par un tulle moustiquaire, élastiques, torches (lampes) électriques avec piles de rechange, éprouvettes (de 110 mm x 10 mm ou de 60 mm x 10 mm) avec bouchons (au lieu d'aspirateurs et de gobelets), coton hydrophile, moustiquaire, solution sucrée à 10 %, crayon ou feutre permanent, ruban adhésif.

1. aspirateur buccal, 2. Aspirateur mécanique, 3. lampe électrique, 4. piles de rechange, 5. ruban adhésif, 6. élastiques, 7. gobelets en papier munis de moustiquaire 8. coton hydrophile.

Figure 14. Equipement de base pour la capture manuelle de moustiques

La capture sur volontaire, nécessite une équipe de deux personnes ou plus, assises à l'intérieur ou à l'extérieur d'une maison et capturant les moustiques qui se posent sur elles quand ils essaient de les piquer (Fig. 15). Deux captureurs peuvent également travailler ensemble : un se découvre les jambes jusqu'au genou et l'autre capture les moustiques qui se posent sur son collaborateur à l'aide d'un aspirateur.

Figure 15. Capture sur volontaire

Ces captures sont généralement effectuées le soir ou la nuit, pour suivre le cycle d'agressivité des anophèles. Si cela est possible, les équipes de captureurs se placent à l'extérieur et à l'intérieur des maisons. Selon l'objectif de l'étude, les collectes se font soit tout au long de la nuit, soit pendant une certaine partie de la nuit. Les collectes effectuées à l'intérieur ont lieu de 18 h 00 à 6 h 00, tandis que celles effectuées à l'extérieur peuvent avoir lieu de 18 h 00 à 22 h 00, en présumant que les personnes sont couchées à 22 h 00 et ne risquent donc pas d'être piquées après 22 h 00. Cependant, dans les communautés où les gens ont tendance à coucher dehors, soit parce qu'il fait chaud, soit pour d'autres raisons, il peut être raisonnable de procéder aussi à des captures à l'extérieur de 18 h 00 à 6 h 00.

Le captureur se découvre les jambes jusqu'au genou et reste assis en essayant de ne pas bouger. Une fois qu'il sent le moustique se poser, la lampe électrique est allumée pour voir le moustique qui est alors aspiré et placé dans le gobelet couvert d'une moustiquaire. Il n'est pas question de laisser le moustique piquer puisqu'il est attrapé dès qu'il se pose. La mesure est donc davantage en rapport avec la pose qu'avec la piqûre.

Les gobelet sont changés toutes les heures et étiquetés en conséquence. Cela permet de compter le nombre de moustiques capturés à telle ou telle heure de la nuit. Les moustiques ainsi capturés sont ensuite triés au cours de la matinée suivante en fonction de leur espèce. Les échantillons sont séparés par espèce, par maison, par jour et par heure de capture.

Ce type de capture est limité par le degré auquel les moustiques sont attirés par les hôtes/appâts humain et des considérations morales portant sur une infection accidentelle. Pour corriger cette limite, on change de captureur toutes les heures ; ou alors ils font la rotation dans les différents points de capture . Ils sont généralement sous traitement antipaludique

prophylactique pour prévenir l'infection. En plus, ils avoir accès immédiatement à des antipaludiques efficaces en cas d'infection.

Capture par pulvérisation au pyrèthre (Pyrethrum Spray sheet Collection : PSC)

Cette méthode est utilisée pour estimer le nombre de moustiques reposant à l'intérieur de pièces où on a dormi la nuit précédente. Ces captures sont généralement effectuées le matin. Les échantillons obtenus par PSC permettent :

- La détermination du statut physiologique de l'abdomen du moustique. Le statut de son abdomen donne une indication de son comportement au repos et de son activité trophique. Les vecteurs peuvent être non nourris, nourris de sang à satiété, semi-gravides ou gravides, selon la longueur de leur séjour dans la pièce.
- La détermination de la densité saisonnière en moustiques vecteurs dans la pièce.
- Une mesure indirecte de la densité des vecteurs lorsqu''ils sont extrêmement endophiles (ils se reposent à l'intérieur).

Equipement de base : Torches/lampes électriques avec piles de rechange, boîtes de Pétri, draps de coton blanc (de 2 m x 1 m, de 2 m x 2 m et de 2 m x 3 m), vaporisateurs (de type à double action), insecticide (pyrèthre à 0,2 – 0,3 % de kérosène), forceps, coton hydrophile, filtres en papier, étiquettes et récipients pour transporter les échantillons.

Avant de procéder à la pulvérisation, faire sortir tous les animaux, couvrir tous les aliments et retirer les petits meubles de la pièce où on va procéder à la capture. Etaler ensuite les draps blancs pour recouvrir complètement le sol et les surfaces plates (sous les tables aussi). Fermer toutes les fenêtres et toutes les portes.

Pulvériser alors dans le sens des aiguilles d'une montre en direction du plafond jusqu'a ce que la pièce soit remplie d'un fin brouillard. Sortir de la pièce rapidement en fermant la porte derrière soi et attendre environ 10 minutes.

En commencant par l'entrée, soulèver les coins du drap et le déporter à l'extérieur. Tous les moustiques attrapés sont recueillis à la lumière du jour avec des forceps et placés dans une boîte de pétri étiquetée, contenant au préalable un morceau de papier filtre posé sur du coton humide (Fig. 16).

Les moustiques recueillis dans chaque maison sont conservés dans des boîtes de pétri distinctes étiquetées en conséquence (par ex. date et heure de collecte, village, numéro de maison/nom du chef de famille).

Figure 16 : Collecte sur drap après pulvérisation au pyrèthre

Capture dans les lieux de repos extérieurs (ORC)

Cette méthode est utilisée pour capturer les moustiques se reposant dehors dans leurs lieux de repos naturels (exophiles) (Fig. 17). Certains vecteurs se nourrissant à l'intérieur et se reposant à l'extérieur, d'autres se nourrissant à l'extérieur et se reposant à l'extérieur, la source des repas de sang de moustiques se reposant dehors indiquera normalement leur préférence en matière d'hôte et leur comportement trophique. Les données provenant de collectes effectuées à l'extérieur sont importantes dans l'évaluation de l'impact de mesures anti vectorielles et fournissent des informations sur :

- Les espèces qui se reposent habituellement à l'extérieur ;
- La proportion de moustiques se reposant à l'extérieur ;
- Les changements saisonniers des lieux de repos extérieurs ;
- Les variations du nombre relatif de moustiques se reposant à l'extérieur après le traitement à l'insecticide de l'intérieur d'habitations.

Equipement de base : Torches/lampes électriques avec piles de rechange, aspirateurs portatifs ou mécaniques fonctionnant sur batterie, gobelets en papier non paraffiné couverts de tulle moustiquaire pour l'entreposage des échantillons, crayon ou feutre permanent pour l'étiquetage et un récipient pour transporter les échantillons.

a b

a. Prélèvement sur végétation à l'aide d'aspirateurs portatifs b. Prélèvement dans une étable à l'aide d'aspirateurs mécaniques (photo : C.A. Sousa)

Figure 17. Capture dans les lieux de repos extérieurs

Les captureurs recherchent des moustiques au repos dans des lieux extérieurs susceptibles d'abriter les moustiques. Il s'agit généralement des endroits ombragés et humides tels que les végétations environnantes, les trous d'arbres, les trous de crabes ou les parois extérieures de maisons près du toit, ainsi que les abris d'animaux domestiques (étables, enclos). Les captures se font généralement pendant la journée, normalement le matin mais parfois en début de soirée, selon l'espèce vectrice.

Capture manuelle (par aspiration) de moustiques dans des lieux de repos intérieurs (IRC)

Les captures manuelles s'effectuent généralement à l'aide d'aspirateurs buccaux ou mécaniques fonctionnant sur batterie (Fig. 18). On recherche les moustiques et on les capture dans les chambres, sur les murs et les meubles d'autres pièces de la maison, à l'aide d'une touche/lampe électrique. Cette méthode permet de recueillir d'importantes informations telles que :

- Les espèces et la proportion de moustiques qui se reposent à l'intérieur des habitations ;
- La densité des moustiques dans les lieux de repos intérieurs, généralement exprimée comme le nombre de moustiques capturés au repos, par captureur et par heure ;
- Les variations saisonnières de la densité des moustiques au repos à l'intérieur des habitations.
- Les variations du nombre relatif de moustiques se reposant à l'intérieur après le traitement à l'insecticide de l'intérieur d'habitations.

Equipement de base : Torches/lampes électriques avec piles, gobelets en papier, éprouvettes/aspirateurs mécaniques ou buccaux, coton hydrophile, étiquettes, solution sucrée à 10 %.

Les collectes sont généralement effectuées tôt le matin quand les occupants quittent la chambre. On maintient généralement les moustiques vivants 24 heures pour évaluer tout effet d'intervention éventuelle, pulvérisation d'insecticide à effet rémanent de l'intérieur des habitations, par exemple.

Figure 18. Capture manuelle de moustiques au repos à l'intérieur des habitations

Capture des moustiques par pièges de sortie (Exit Trap Catches : ETC)

Cette méthode consiste à fixer les pièges aux fenêtres des chambres pour déterminer le mouvement des moustiques pendant la nuit et leur comportement de repos (Fig. 19).

Figure 19 : Fenêtre-piège

Equipement de base : Torches/lampes électriques et piles, cages, gobelets en papier, aspirateurs/éprouvettes, forceps, coton hydrophile, filtre en papier, étiquettes, solution sucrée à 10 %.

Les moustiques sont récupérés à l'intérieur des pièges, généralement le matin et sont placés dans des gobelets en papier pour être transportés au laboratoire.

Au laboratoire, les moustiques femelles sont disséqués pour déterminer l'état physiologique de l'abdomen. La présence de jeunes moustiques non nourris suggère qu'ils n'ont pas réussi à se nourrir. La présence de moustiques nourris de sang suggère qu'ils sortaient de la pièce pour aller se reposer ailleurs et développer leurs ovaires. La présence de moustiques gravides suggère qu'ils ont développé leurs ovaires au repos à l'intérieur et sortent pour pondre à l'extérieur.

6.2 Enregistrement des informations de collectes

Les caractéristiques de chaque site de collecte doivent être décrites, notamment :

- la localité et l'emplacement géographique (coordonnées de GPS, nom de la localité) ;
- le type de maison et de matériaux de construction ;
- le nombre de chambres et de pièces dans la maison ;
- le nombre de personnes ayant dormi dans la maison la nuit précédente et si une moustiquaire a été utilisée (avec ou sans insecticide) ;
- le type et les caractéristiques générales des abris extérieurs.

Il convient de noter également des informations sur la date et l'heure des collectes et d'étiqueter les échantillons de moustiques pour pouvoir les identifier en fonction de la collecte à laquelle ils appartiennent. Un exemple de formulaire de collecte de données figure en Annexe II.

Il existe d'autres méthodes de collecte de moustiques adultes utilisées dans des situations particulières ; notamment : les pièges lumineux, les tentes-pièges, les rideaux colombiens et les doubles moustiquaires. Le participant est encouragé à consulter les références pour obtenir des informations additionnelles.

6.3 Conservation des échantillons

Différentes méthodes de conservation sont utilisées ; celles-ci dépendent du type d'analyse en laboratoire envisagés. Les méthodes de conservation sont détaillées dans l'unité d'apprentissage N°7.

Unité 7
La préparation et la conservation des échantillons de moustiques

Objectifs de l'apprentissage

Cette unité d'apprentissage porte essentiellement sur les points suivants :

- **Principales techniques de laboratoire utilisées pour analyser les échantillons de moustiques et objectifs des analyses ;**
- **Description des parties du corps du moustique destinées à chaque technique, ainsi que le mode de préparation et d'conservation des échantillons de moustiques.**

Les échantillons de moustiques obtenus à la suite des études sur les larves et les adultes peuvent être analysés à l'aide de diverses techniques de laboratoire pour obtenir d'importantes informations sur la biologie des espèces de moustiques et leur rôle comme vecteurs du paludisme. Les échantillons de moustiques sont généralement utilisés pour :

- l'identification morphologique des espèces et des complexes d'espèces en vue d'évaluer les populations de moustiques vecteurs ;
- la détermination de l'état gonotrophique pour étudier le comportement au repos ;
- la détermination de l'âge physiologique et l'insémination des femelles pour étudier la longévité et la survie de population de moustiques ;
- la détection des parasites du paludisme chez les moustiques pour déterminer l'indice sporozoïtique ;
- la détermination de l'origine du repas de sang pour étudier les préférences en matière d'hôte ;
- les analyses cytogénétiques et moléculaires pour identifier les espèces jumelles ;
- l'analyse moléculaire pour étudier les gènes associés à la résistance aux insecticides.

7.1 Principales techniques de laboratoire

Les techniques de laboratoire suivantes sont souvent employées pour analyser des échantillons de moustiques prélevés dans la nature dans le cadre des études entomologiques.

Identification morphologique espèces

Outre la distinction entre anophèles et culicinés, les structures morphologiques peuvent également permettre de distinguer les complexes d'espèces d'anophèles par rapport aux espèces de culicidés (voir la section 3.5 de l'Unité 3). Cela peut se faire en observant les caractéristiques propres aux espèces, tant aux stades immatures qu'au stade adulte. Il convient donc de préserve les moustiques en très bon état. On conserve les adultes dans des boîtes entomologiques avec du coton hydrophile et du papier filtre pour éviter qu'ils ne perdent des parties du corps au cours du transport. Les larves sont conservées dans des tubes contenant de

l'éthanol à 80 %. L'identification nécessite i) le montage des spécimens sur lame porte-objet et lamelle couvre-objet (moustiques immatures ou parties du corps d'adultes) en vue de leur observation au microscope et ii) le montage des spécimens adultes sur des épingles en vue de leur observation au stéréomicroscope. L'identification morphologique se base sur l'utilisation de clés taxonomiques. Ces techniques d'identification seront détaillées dans un cours de niveau intermédiaire.

Dissection de moustiques

On a recours à la dissection pour isoler certains organes internes du moustique femelle et les observer au microscope, notamment :

- la spermathèque, pour déterminer si la femelle a été inséminée ;
- les ovaires, pour évaluer l'âge physiologique de la femelle (*par ex.* l'état de parité) ;
- l'estomac, pour détecter les oocystes du parasite du paludisme ;
- les glandes salivaires, pour détecter les sporozoïtes du parasite du paludisme.

Les moustiques à disséquer doivent être frais. Dans des conditions idéales, ils sont tués ou anesthésiés dans le congélateur juste avant leur dissection. Cela nécessite de transporter les moustiques vivants une fois attrapés, soit dans des gobelets en papier, soit dans des cages.

Il existe d'autres techniques plus sophistiquées qui permettent de répondre à des questions particulières en rapport avec la biologie du vecteur de maladies. Celles-ci sont résumées aux sections suivantes.

Tests ELISA

Ces techniques immunochimiques ont recours à des anticorps pour détecter des protéines particulières (antigènes). Dans l'entomologie du paludisme, deux analyses ELISA sont communément employées :

- **Détection d'antigènes circumsporozoïtiques par analyse ELISA (CS-ELISA) :** Cette méthode permet de détecter la protéine circumsporozoïtique (CS) qui recouvre la surface externe du sporozoïte du paludisme et constitue donc un indicateur de l'état infectieux du parasite du paludisme. Cette protéine commence à être exprimée quand le sporozoïte est encore dans l'oocyste mature, dans l'intestin du moustique. On n'analyse donc que les têtes et les thorax des moustiques femelles pour s'assurer que, si la CS est détectée, elle provient très probablement de sporozoïtes qui ont atteint les glandes salivaires et la femelle est donc prête à transmettre les parasites du paludisme. Pour cette analyse, les moustiques peuvent être conservés à secs, à température ambiante, à l'intérieur de tubes contenant du gel de silice et du coton.
- **ELISA de repas de sang :** Cette analyse permet de détecter l'origine du sang avec lequel s'est nourri le moustique femelle avant d'être capturé. Les anticorps réagissant à des antigènes sanguins particuliers de divers hôtes (*par ex.* humains, vaches, porcs, chiens, poulets) peuvent être utilisés dans le test ELISA pour identifier la source de sang. Le repas de sang présent dans la femelle (récent de préférence) est prélevé en écrasant

l'abdomen sur un papier filtre. On laisse ensuite les taches de sang sécher à température ambiante jusqu'à l'analyse.

Analyse cytogénétique

Cette technique consiste à préparer des chromosomes polytènes en vue d'une observation au microscope des spectres de bandes chromosomiques qui peuvent être soient spécifiques à l'espèce soit polymorphiques. Ces chromosomes polytènes (« géants ») ne se trouvent dans les cellules que de certains tissus/organes de moustiques et uniquement à certains stades du cycle de vie, ou chez un sexe particulier. Par exemple, chez *An. gambiae*, les chromosomes polytènes se trouvent dans les ovaires de femelles semi-gravides ou les glandes salivaires des larves L4. La conservation d'échantillons en vue d'une analyse cytogénétique se fait normalement dans une solution de Carnoy (1 volume d'acide acétique pour 3 volumes d'éthanol absolu) entreposée à 4°C (réfrigérateur) ou à -20°C (congélateur) pour une longue durée.

Analyse moléculaire basée sur ADN/ARN

Ces techniques sont généralement utilisées pour différencier les membres des complexes d'espèces jumelles ou pour étudier les gènes d'intérêt, ceux associés à la résistance aux insecticides par exemple. Les techniques basées sur l'AND permettent la révélation du polymorphisme génétique dans des gènes d'intérêt chez des populations de moustiques. Les techniques basées sur l'ARN permettent d'étudier les nivaux d'expression de ces gènes.

L'ADN est une molécule très stable, cela rend facilite la conservation de spécimens en vue d'une extraction d'ADN. Les moustiques sont généralement conservés à sec (dans des éprouvettes remplies de gel de silice + coton) à température ambiante ou préservés dans de l'éthanol à 80 %. De plus, selon les techniques, on peut obtenir pour ces études une quantité suffisante d'ADN sur de très petites parties du corps (*par ex.* une patte).

L'ARN, en revanche, est très instable, ce qui complique la conservation du matériel biologique en vue de son analyse, notamment dans les conditions de terrain. Dans des conditions idéales, les moustiques sont immobilisés et immédiatement entreposés dans de l'azote liquide (-180°C) ou à -80°C. L'utilisation d'agents de conservation (RNAlatter® par exemple) permet de conserver les échantillons à température ambiante ou au réfrigérateur, mais seulement pour quelques heures ou quelques jours.

Pour la conservation de moustiques en vue d'études moléculaires, il est important d'entreposer chaque moustique (ou partie du corps) dans une seule éprouvette ;cela permet d'éviter une contamination entre spécimens. Car, lorsque plusieurs moustiques sont placés dans la même éprouvette, il y a un risque de contamination.

7.2 Traitement des échantillons de moustiques

Dans la préparation d'échantillons de moustiques en vue d'analyses de laboratoire poussées, les parties du corps d'un seul moustique peuvent être utilisées pour différentes analyses. Par exemple, pour une femelle semi-gravide, la tête et le thorax peuvent être gardés pour une analyse CS-ELISA, l'abdomen peut être disséqué pour récupérer les ovaires en vue d'une

analyse cytogénétique et les pattes peuvent être utilisées pour l'extraction d'ADN. Le Tableau 3 décrit les parties du corps pouvant être utilisées pour différentes analyses de laboratoire et leur mode de conservation.

Tableau 3. Techniques de conservation des parties du moustique pour les analyses de laboratoire

Technique	Matériel biologique	Etats gonotrophique	Conditionnement de conservation	Température de conservation
Extraction d'ADN	Moustiques entiers ou parties du corps	Quelconque	Adultes : gel de silice et coton. Larves : éthanol à 80 %	Température ambiante (environnement sec)
Extraction d'ARN	Moustiques entiers	Quelconque	Azote liquide *RNAlater®*.	-180°C (azote liquide) -20°C ou -80°C (*RNAlater®*)
Cytogénétique	Ovaires	Semi-gravide	Solution de Carnoy	4°C à -20°C
CS-ELISA	Tête + thorax	Quelconque	Gel de silice et coton.	Température ambiante (environnement sec)
ELISA repas de sang	Abdomen (repas de sang)	Nourri de sang à satiété	Filtre en papier Whatman n°1.	Température ambiante (environnement sec)

Pour que ces procédures réussissent, il est essential d'adopter un bon système d'étiquetage et d'identification des échantillons. Toutes les éprouvettes (et les papiers-filtres) contenant des parties de corps d'un moustique doivent être étiquetées et porter le même numéro ou code d'échantillon. Les codes d'échantillon doivent être informatifs, simples et sans équivoque. L'étiquetage est complété par une base de données qui décrit le moustique échantillonné.

Durant le processus d'échantillonnage, il est très important de manipuler les moustiques avec précaution pour éviter une contamination entre spécimens. Il faut toujours utiliser si possible un matériel jetable, et stériliser l'équipement de dissection (forceps et aiguilles) d'un spécimen à l'autre.

Etiqueter les éprouvettes contenant des solutions de préservation liquide (éthanol, Carnoy) avec des étiquettes en papier qui sont placées à l'intérieur et écrites au crayon. Les tubes de gel de silice peuvent être marqués au feutre permanent. Les étiquettes peuvent être protégées de ruban adhésif.

7.3 Réactifs et équipement de base

Principal équipement : Stéréomicroscope et microscope optique.

Equipement : Forceps entomologiques et aiguilles de dissection, épingles à insecte, élastiques, lames porte-objet, lamelles couvre-objet, lamparine, coton hydrophile, tubes de plastique (0,5 ml, 1,5 ml, 15 ml), verrerie de laboratoire diverse, papier filtre (Whatman n° 1), feutres permanents, crayons, étiquettes de papier (papier sulfurisé), ruban adhésif, carnet.

Réactifs : éthanol absolu, eau distillée, acide acétique, gel de silice, milieu de montage pour la préparation des lames (*par ex.* entellan®).

7.4 Bonnes pratiques de laboratoire

- Le laboratoire doit toujours rester propre et bien organisé ;
- Porter des gants et masques de protection pour manipuler des réactifs toxique ou dangereux. Prendre connaissance des informations de sécurité accompagnant les réactifs avant de les appliquer ;
- Nettoyer et stériliser le matériel de dissection d'un spécimen à un autre ;
- Toujours utiliser un seul tube pour chaque partie du moustique ;
- Toujours étiqueter les tubes de la même manière et de façon lisible ;
- Consigner correctement les informations relatives à chaque moustique échantillonné et veiller à ce que la base de données reste à jour ;
- Prendre soin du matériel optique, microscopes notamment.

Unité 8
Les indices de la transmission du paludisme et les facteurs associés

Objectifs de l'apprentissage

Il existe plusieurs systèmes de transmission du paludisme dans différentes zones géographiques. Cette unité d'apprentissage a pour but d'apporter des connaissances de base dans les domaines suivants :

- **Méthodes d'incrimination des vecteurs du paludisme ;**
- **Indicateurs entomologiques de transmission et comment calculer les indices de la transmission ;**
- **Facteurs majeurs affectant la transmission du paludisme.**

8.1 Incrimination des vecteurs du paludisme

Pour pouvoir conclure qu'une espèce est vectrice du paludisme, il est important de démontrer les faits suivants :

- un contact entre le moustique et les hommes a lieu et ce moustique se nourrit du sang humain ;
- il existe une relation, tant dans le temps que dans l'espace, entre le moustique et les cas locaux de paludisme ;
- les glandes salivaires du moustique contiennent des sporozoïtes (le stade du parasite du paludisme qui infecte les humains).

Plusieurs éléments sont nécessaires pour pouvoir incriminer les vecteurs, notamment :

- la présence et l'abondance des moustiques ;
- le comportement trophique du vecteur : où ? et quand ? le moustique pique/se nourrit, ainsi que la source du repas de sang ;
- l'âge ou la parité de la population vectorielle ;
- la proportion de moustiques d'une espèce donnée qui sont infectés par les sporozoïtes.

Les informations ci-dessus peuvent être tirées d'études longitudinales mettant en jeu certaines techniques d'échantillonnage dont quelques-unes sont traitées dans l'Unité 6. Les données issues de ces études permettent de calculer les indicateurs entomologiques spécifiques suivants :

- les habitudes de repos du vecteur,
- le taux d'anthropophilie,
- la longévité,
- le taux d'infection,

- L'indice d'anthropophilie,
- le taux d'inoculation entomologique (EIR),
- la capacité vectorielle.

8.2 Techniques utilisées pour incriminer les vecteurs

Détermination du stade de digestion du sang et développement ovarien

Le stade de digestion du sang et de développement des œufs (*c-à-d.* stade gonotrophique) déterminent la coloration et la forme de l'abdomen du moustique (Fig. 20):

- *à jeun* – abdomen vide (pas de repas de sang) ;
- *gorgé* – rouge vif avec les ovaires (partie blanche) au bout ;
- *semi-gravide* – sang de couleur rouge foncé couvrant 3 ou 4 segments et ovaires/œufs couvrant le reste de l'abdomen ;
- *gravide* – le sang est absent ou se présente sous forme de petite tache noire sur la surface ventrale de l'abdomen, les ovaires/œufs couvrant presque tout l'abdomen.

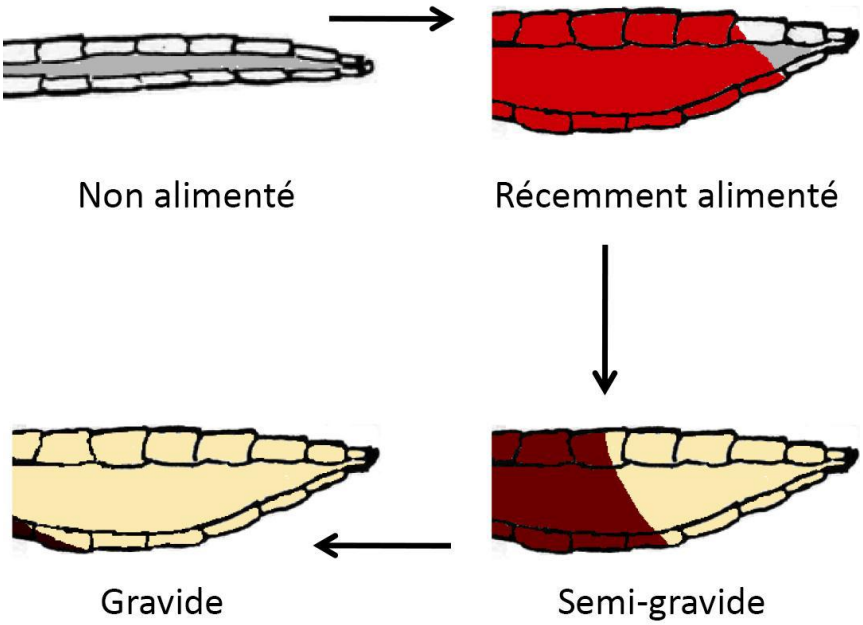


Figure 20. Etat abdominal d'un moustique femelle en fonction de son stade gonotrophique

Détermination du taux de parité

La dissection de l'abdomen et l'observation au microscope de la morphologie des ovaires peuvent déterminer si :

- le moustique femelle a pondu des œufs au moins une fois dans sa vie, dans ce cas il est pare ;
- le moustique femelle n'a jamais pondu d'œufs, alors il est nullipare.

Ceci permet d'estimer les taux de parturité de la population de moustiques, *c-à-d.* la proportion de femelles pares ; ce paramètre reflète l'âge de la population des moustiques. Les populations de moustiques plus âgées présenteront des taux de parité plus élevés. Les populations plus âgées sont davantage susceptibles de transmettre le paludisme parce qu'elles ont vécu suffisamment longtemps pour permettre au parasite de se développer. Effet, un moustique prélève au moins deux repas de sang, pour pouvoir transmettre le paludisme.

Détermination du taux d'infectivité

La présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique indique qu'il est capable de transmettre les parasites du paludisme aux hommes. Ceci peut être déterminé par dissection et examen au microscope des glandes salivaires du moustique ou par analyse ELISA. Ces données permettent d'estimer le taux d'infectivité d'une population de moustiques.

Détermination de l'origine des repas de sang et préférences en matière d'hôtes

Une technique ELISA peut également permettre de déterminer l'origine du repas de sang chez un moustique femelle (*c-à-d.* si la femelle s'est nourrit sur un hôte humain ou animal).

8.3 Estimation des indices de transmission

Cette section est consacrée aux moyens qui permettent d'estimer certains des indices entomologiques les plus importants dans la caractérisation de la transmission du paludisme par une population vectrice. Certains paramètres, tels que la longévité ou la survie par exemple, exigent le recours à des formules mathématiques complexes et une formation complémentaire.

Densité de moustiques au repos à l'intérieur (D)

Les densités au repos à l'intérieur sont estimées comme suit :

- des moustiques au repos à l'intérieur d'habitations sont capturés dans un certain nombre de maisons sélectionnées dans une zone par méthode PSC. Les maisons retenues sont généralement de même taille ;
- les moustiques ainsi capturés sont alors séparés et comptés par espèce et par sexe ;
- le nombre total de femelles collectées pour chaque espèce est divisé par le nombre total de maisons prospectées ;
- l'échantillonnage s'effectue généralement pendant deux ou trois nuits par mois et on prend la moyenne des trois nuits ;

- les densités au repos sont donc exprimées comme étant le nombre de femelles par maison et par nuit. Par exemple :
  - en supposant qu'un total de 765 moustiques femelles d'une espèce donnée aient été capturées par PSC dans quatre maisons prospectées pendant trois nuits consécutives,

Densité intérieure (D) = (nombre de femelles ÷ nombre de maisons) ÷ nombre de nuits

D = (765 femelles ÷ 4 maisons) ÷ 3 nuits = 63,8 moustiques/maison/nuit.

Taux d'agressivité (ma)

Le taux d'agressivité (ma) est exprimé comme le nombre de piqûres qu'une personne reçoit d'une espèce vectrice particulière par nuit. Ce paramètre peut être directement estimé à partir des captures sur volontaire, comme suit:

- on divise le nombre total de moustiques capturés par le nombre total de captureurs ;
- quand les collectes sont effectuées pendant toute la nuit (*c-à-d.* 12 heures), le taux d'agressivité est exprimé comme le nombre de piqûres par personne par nuit:

Taux d'agressivité (ma) = nombre de moustiques capturés ÷ nombre de captureurs

- quand les captures ne sont effectuées que pendant une partie de la nuit, on divise le nombre total de moustiques capturés par le nombre total de captureurs et par le temps consacré à la capture. Par exemple :
  - en supposant que cinq captureurs aient attrapé 150 moustiques en quatre heures, le taux d'agressivité serait :

Taux d'agressivité (ma) = nombre de moustiques ÷ nombre de captureurs ÷ nombre d'heures de capture

ma = 150 moustiques ÷ 5 captureurs ÷ 4 heures = 7,5 piqûres/homme/heure

Ce paramètre peut être calculé indirectement lors de collectes PSC (pulvérisation au pyrèthre) :

- Toutes les femelles récemment gorgées de sang (**F**) sont séparées par espèce et comptées.
- Le nombre total de femelles d'une espèce capturées est alors divisé par le nombre total d'occupants (**W**) qui ont passé la nuit dans les pièces où les captures ont eu lieu. Par exemple :
  - en supposant qu'on ait capturé 63 moustiques gorgés (**F**) dans 3 maisons (pièces) en une nuit et qu'un total de 8 personnes (**W)** aient passé la nuit dans ces 3 maisons (pièces),

ma = **F** ÷ **W** = 63 ÷ 8 = 7,9 piqûres par nuit.

Les hypothèses émises dans cette estimation indirecte sont les suivantes :

- tous les moustiques gorgés ont piqué les occupants de la maison cette nuit-là ;
- aucun moustique gorgé n'a quitté la maison cette nuit-là.

Si l'on connaît l'indice d'anthropophilie de l'espèce vectrice, le taux d'agressivité calculé par PSC peut alors être ajusté en le multipliant par la valeur de l'indice d'anthropophilie.

Indices d'endophagie et d'exophagie pour les préférences en matière d'alimentation

Les indices d'endophagie et d'exophagie peuvent être directement obtenus à partir des estimations du taux d'agressivité calculés à partir des appâts humain. Cela implique :

- des captures simultanées par des volontaires placés à l'intérieur et à l'extérieur d'habitations ;
- le calcul des taux d'agressivité intérieurs et extérieurs ;
- le calcul de l'indice d'agressivité comme proportion des femelles d'une espèce donnée qui piquent à l'intérieur des habitations (l'indice d'exophagie étant la proportion des femelles qui piquent à l'extérieur des habitations). Par exemple :
  - en supposant qu'en quatre heures de capture, deux captureurs aient attrapé 168 *An. gambiae* s.*l.* femelles à l'intérieur des chambres à coucher et qu'en même temps deux autres aient attrapé 122 *An. gambiae* s.*l.* femelles à l'extérieur dans le même village,

    1. Le taux d'agressivité intérieur est :

    ma(i)=168 femelles ÷ 2 captureurs à l'intérieur ÷ 4 heures de capture = 21,0 piqûres/homme/heure

    2. Le taux d'agressivité extérieur est :

    ma(o)=122 femelles ÷ 2 captureurs à l'extérieur ÷ 4 heures de capture = 15,3 piqûres/homme/heure

    3. L'indice d'endophagie (ENGI) est donc :

    ENGI = ma(i) ÷ [ma(i) + ma(o)] = 21,0 ÷ (21,0 + 15,3) = 0,58

    4. L'indice d'exophagie (EXGI) est donc :

    EXGI = ma(o) ÷ [ma(o) + ma(i)] = 15,3÷ (15,3 + 21,0) = 0,42

Noter que ENGI+EXGI égale toujours 1.

Taux d'infection

Le taux d'infection est la proportion de moustiques d'une espèce donnée, porteurs de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires (soit par dissection soit pas analyse CS-ELISA). Par exemple :

- en supposant que 1 500 anophèles femelles de la même espèce soient analysées par test CS-ELISA et que sur celles-ci 32 soient positives à la détection de la protéine circumsporozoïtique (indicateur de la présence de sporozoïtes),

Taux d'infection (s) = nombre de moustiques positifs ÷ nombre total de moustiques analysés

s = 32 moustiques positifs ÷ 1 500 moustiques analysés = 0,021 (soit 2,1 %)

Indice d'anthropophilie (Human Blood Index : HBI)

L'indice HBI peut être obtenu par analyse des repas de sang, généralement par techniques ELISA, effectuée sur des espèces identifiées attrapées sur le terrain lors de capture de moustiques dans les lieux de repos. L'indice HBI est alors calculé comme la proportion de femelles d'une espèce donnée, portant du sang humain dans leur estomac. Des indices similaires peuvent être calculés pour tout type de repas de sang présent dans les échantillons analysés. Par exemple :

- en supposant qu'une analyse ELISA de repas de sang chez une espèce d'*Anopheles* donnée ait révélé que 83 s'étaient nourris sur l'homme, 11 sur le poulet et 36 femelles sur le chien,

HBI = nbre de repas sur homme ÷ (nbre de repas sur homme + nbre de repas sur poulet + nbre de repas sur chien)

HBI = 83 ÷ (83 + 11 + 36) = 0,63

Habitudes de repos d'un vecteur après l'ingestion d'un repas de sang

La détermination des lieux de repos des moustiques après un repas de sang est très importante pour évaluer le potentiel d'un outil d'intervention (pulvérisation intra domiciliaires d'insecticide à effet rémanent par exemple) à perturber la transmission. Les habitudes de repos après le repas de sang (f) peuvent être calculées à l'aide des autres paramètres décrits plus haut :

$$f = [k \times H \times D] \div [N \times P \times M]$$

Où :

k = une constante de correction de 1,16,
H = estimation de l'indice HBI,
D = densité au repos à l'intérieur calculé par collecte PSC,
N = nombre moyen de personnes par maison,
P = durée du repos à l'intérieur après un repas de sang. Ce paramètre est obtenu par analyse de l'état abdominal de femelles au repos. P = 1 + (nombre de femelles demi-gravides et gravides ÷ nombre de femelles récemment nourries),
M = estimation du taux d'agressivité mensuel.

Taux d'inoculation entomologique (Entomological Inoculation Rate : EIR)

L'EIR est le nombre de piqûres infectantes reçues par homme et par nuit. S'il existe des méthodes plus compliquées de calcul de cet indice, la plus simple est la suivante :

EIR = [taux d'agressivité (ma)] x [taux d'infection (s)]

En supposant par exemple que pour une espècedonnée A, le taux d'agressivité ait été déterminé comme étant ma = 7,9 et le taux d'infection s = 0,003,

EIR = ma x s = 7,9 x 0,003 = 0,02 piqûres infectantes/homme/nuit

Cela signifie qu'en un mois de 31 jours, on peut s'attendre à 0,62 piqûre infectante (0,02 x 31 jours) de l'espèce A. L'EIR annuel pour cette espèce serait d'environ 7 (0,02 x 365 jours) piqûres infectantes par an.

8.4 Facteurs affectant la transmission du paludisme

L'intensité de la transmission du paludisme est affectée par des facteurs environnementaux et anthropogènes/démographiques. Les facteurs environnementaux semblent avoir un impact variable en fonction des espèces vectrices. Les principaux facteurs environnementaux qui affectent la transmission du paludisme sont les suivants :

Les précipitations : Dans les régions subtropicales et tropicales, on attribue aux variations de précipitations le caractère saisonnier de la plupart des espèces de moustiques. Les précipitations créent les gîtes de reproduction temporaires qui jouent un rôle primordial dans l'augmentation subite de la densité de populations de certaines espèces vectrice, ainsi que des poussées soudaines du taux de transmission. Par exemple, il existe généralement une corrélation positive entre les précipitations et la densité des populations adultes ou des colonies d'*An. arabiensis* et d'*An. gambiae s.l.* Cette corrélation est cependant négative pour ce qui est des colonies d'*An. funestus*.

La température et l'humidité : Si la température constitue dans les régions tempérées le principal facteur déterminant influençant la dynamique des populations d'anophèles, cet effet semble comparativement moins évident dans les climats tropicaux. Les anophèles deviennent inactifs à des températures basses. Une eau froide ralentit le développement larvaire et l'émergence des adultes. La longévité des moustiques est cependant sensiblement réduite à des températures au-dessus de 35°C et à une humidité relative au-dessous de 50 %. Une fois accouplées, les femelles d'*An. gambiae* peuvent, grâce à l'estivation, survivre à de longues périodes de chaleur et de sécheresse. On sait également que certaines espèces de moustiques de régions tempérées hibernent pendant la saison froide.

L'altitude : La transmission du paludisme a généralement tendance à baisser au fur et à mesure qu'augmente l'altitude. On ne trouve généralement pas d'anophèles à des altitudes de plus de 2 000 mètres. La température baisse en moyenne de 6,5°C tous les 1 000 m et ce refroidissement ralentit le développement du parasite du paludisme à l'intérieur du moustique, influençant ainsi sa transmission.

Les facteurs anthropogènes/démographiques : Il s'agit notamment du type d'habitation, des activités humaines qui favorisent la disponibilité de gîtes de reproduction, de la pauvreté et de comportements associés au niveau de compréhension des risques de transmission du paludisme, ainsi que des pratiques socio-culturelles.

Unité 9
Les principes essentiels de l'élevage de moustiques en laboratoire

Objectifs de l'apprentissage

Cette unité d'apprentissage porte sur les points suivants :

- **Caractéristiques de base d'un insectarium ;**
- **Conditions de base pour l'élevage des larves et adultes d'anophèles au laboratoire.**

9.1 L'insectarium et son principe de base

Un insectarium est un endroit où des insectes sont élevés et maintenus dans des conditions de laboratoire. Selon l'objectif souhaité, il peut s'agir d'installations simples ou sophistiquées. A des fins de lutte anti-vectorielle courante, un insectarium peut être relativement peu onéreux.

L'insectarium joue un rôle important dans le maintien d'un nombre adéquat de moustiques en vue d'observation, d'identification et de diverses analyses ; par exemple ; tests de sensibilité aux insecticides, estimation de la longévité et habitudes alimentaires.

L'insectarium peut consister en une petite pièce consacrée à l'entretien de colonies de larves et d'adultes (Fig. 21) ou, de préférence, deux pièces dont l'une est réservée aux colonies de larves et l'autre à celles d'adultes.

Figure 21. Image d'un insectarium avec des plateaux de larves et des cages pour adultes

Un insectarium peut parfois abriter des colonies d'espèces parfaitement sensibles, ainsi que des espèces collectées dans la nature (locales). Dans ce cas, il est important que les espèces (notamment les espèces sensibles) ne se contaminent avec les espèces sauvages.

Un insectarium doit être établi avec l'idée d'empêcher les moustiques de s'échapper ou d'entrer d'eux-mêmes. Son plafond est généralement bas (pas plus de 2,20 m) ; le sol et les murs sont en ciment, peint de couleur claire (blanc ou blanc cassé). Ces caractéristiques sont nécessaires pour pouvoir repérer les spécimens pouvant s'échapper. Les portes et les fenêtres sont munies de moustiquaires. De plus, Il faut prévoir :

- des conditions de sécurité adéquates pour prévenir l'entrée de personnes non autorisées ;
- des meubles en métal antirouille, en fibre de verre, en plastique ou au moins en bois poli propre. Les pieds ne seront pas en contact direct avec le sol (reposant généralement sur des bidons remplis d'huile) ou avec les murs pour prévenir l'invasion de fourmis et autres insectes rampants.

Des connaissances sur les conditions de survie de diverses espèces de moustiques vecteurs (température, alimentation, humidité et lumière) sont primordiales, si l'on veut réussire l'élevage en laboratoire.

Il faut prendre précautions strictes pour prévenir la prolifération microbienne, laquelle constitue une grave menace pour la survie de colonies d'insectes. Un insectarium doit être propre et bien disposé. Il faut veiller à ce qu'aucun insecticide ou produit chimique n'y pénètre.

Il faut également veiller à ce que les aliments pour insectes ne moisissent pas ; réfrigérer les aliments larvaires et en préparer une quantité voulue au fur et à mesure. La solution sucrée donnée aux adultes est particulièrement sensible à la prolifération microbienne et il convient de la changer régulièrement.

Il est important de lutter régulièrement contre les autres insectes, en particulier les fourmis et les battes ; celles-ci ayant tendance à se nourrir sur les colonies de moustiques.

Il faut maintenir un horaire régulier de tâches spécifiques (*par ex.* heures auxquelles alimenter les larves, recueillir les œufs, donner des repas de sang aux moustiques adultes). Une bonne pratique consiste à mettre au point et à afficher les horaires en un lieu aisément accessible ou à les consigner dans un carnet.

Il est impératif de préserver la pureté génétique des colonies d'insectes. Une fois qu'un stock d'insectes est contaminé, il ne sert plus à grand chose. Il est donc crucial de prévenir la contamination croisée des œufs, des larves et des adultes volant librement dans l'insectarium, toutes des sources de contamination du stock.

Une bonne nutrition est essentielle à la survie et à la fécondité de la colonie de moustiques. L'optimisation de la nutrition, de la photopériode, de la compétition (c-à-d. les densités larvaires et adultes à l'intérieur des plateaux et des cages, respectivement) et de la température résultera en une colonie plus productive.

9.2 Conditions générales d'élevage de moustiques

Œuf

Seules quelques espèces d'anophèles sont aisément élevées en insectarium. Il existe pour celles-ci deux façons de commencer une souche avec des moustiques sauvages locaux. Une souche peut commencer soit avec des femelles adultes attrapées au repos, s'étant déjà gorgées de sang, que l'on nourrit par la suite avec une solution sucrée jusqu'à ce qu'elles pondent ; soit avec des larves prélevées dans la nature, que l'on élève jusqu'au stade adulte pour produire ensuite une première série d'œufs en alimentant les femelles avec du sang. Les étapes sont les suivantes :

- on recueille des larves ou des femelles gorgées de sang au repos à l'intérieur d'habitations et on les place dans une cage dans l'insectarium ;
- on les maintient dans l'insectarium à une humidité relative (80 %) et une température (27°C) stables ;
- on nourrit les adultes avec une solution à 10 % de sucre ;
- pour inciter les adultes à pondre, il faudra peut-être les nourrir de sang (dans le cas d'adultes élevés dans l'insectarium à partir de larves) ;
- placer des plateaux de ponte à l'intérieur des cages pour récupérer les œufs. Il suffit d'utiliser les parties du haut ou du bas de boîtes de pétri où l'on met un peu d'eau et un morceau de papier filtre (ou tout autre arrangement similaire).

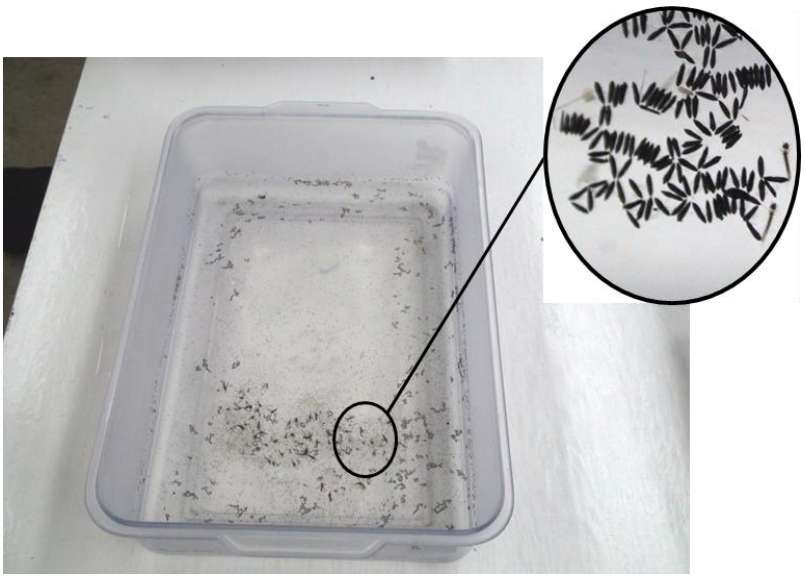


Figure 22. Plateau contenant des œufs et des larves de 1er stade

Procédure de base pour l'incubation d'œufs

- Couvrir le fond d'un plateau avec de l'eau désionisée et ajouter une solution de levure à une concentration de dissolution finale de 0,02 % (par ex. 300 ml d'eau et 3 ml d'une solution de levure à 2 %).

- Rincer doucement les œufs dans le plateau, le couvrir et le laisser 24 heures sans y toucher en s'assurant que les œufs ne vont pas coller aux bords du plateau au-dessus de la solution.
- Les œufs éclosent dans les 24 à-48 heures. Observer la présence de larves de premier stade à la lumière vive (Fig. 22).

Larves

La température est le facteur externe le plus important qui affecte le taux de croissance des larves. Une température d'eau constante d'environ 27°C est primordiale pour le développement des larves.

La pièce réservée aux larves doit être munie d'une grande fenêtre de verre qui laisse pénétrer la lumière du jour ou un système d'éclairage artificiel permettant l'alternance de cycles de 12 heures de jour/12 heurs de nuit, autre facteur environnemental primordial pour le développement des larves.

On nourrit les larves deux fois par jour, généralement avec un aliment piscicole moulu. La qualité et la quantité du régime alimentaire sont importantes pour la longévité et la fécondité du stade adulte. La mortalité larvaire peut être élevée si elles sont trop nourries et une sous-alimentation produira des adultes plus petits. Le premier repas doit avoir lieu 24 heures après l'éclosion des œufs. Les larves de premier stade ont besoin de se nourrir davantage que celles de quatrième stade.

Il faut vérifier l'absence d'algues à l'intérieur des plateaux de larves ; celles-ci peuvent entraîner un taux de mortalité élevé. Il est important de changer l'eau d'élevage tous les jours ou tous les 2 jours et de se débarrasser des larves mortes dans les plateaux. Il faut manipuler les larves doucement, surtout lors de leur transfert d'un plateau à un autre.

Il faut veiller à ne pas surcharger les plateaux de larves ; cela affecte leur développement du fait de la compétition pour accéder à la nourriture et du cannibalisme.

Nymphes

Le moustique ne s'alimente pas à ce stade. Il faut observer tous les jours les plateaux de larves pour voir s'il y a des nymphes. Les nymphes sont retirées des plateaux et placées dans des cages pour l'émergence des adultes. La séparation des nymphes des larves se fait simplement avec une pipette ou un filet à mailles fines sur spatule ; on place les nymphes dans un gobelet pour les transférer dans une cage (Fig. 23). Quand elles sont nombreuses, les larves ont tendance à plonger vers le fond du récipient quand elles sont perturbées, alors que les nymphes ont tendance à rester à la surface, ce qui facilite leur collecte. On peut agiter un gobelet contenant des larves et des nymphes ; les larves se dirigent vers le fond mais les nymphes restent sur les côtés et peuvent ensuite être séparées avec une pipette. On peut aussi utiliser de l'eau froide pour réduire l'activité larvaire et nymphale et faciliter la séparation (mais cela doit se faire rapidement pour éviter de nuire aux stades en développement), ce qui permet

ensuite de verser les nymphes sur un tamis pour les transférer dans une eau à température ambiante.

Figure 23. Séparation des nymphes des larves à l'aide d'une pipette

Adultes

Les adultes peuvent être conservés dans des gobelets couverts de tulle moustiquaire. Ces gobelets ne coûtent pas cher, ils peuvent contenir 10 à 15 adultes. On pratique généralement un trou sur le tulle moustiquaire pour transférer les adultes dans le gobelet, et l'on ferme avec du coton hydrophile. Des cages peuvent être employées pour un nombre plus important d'adultes. Il faut manipuler les adultes avec précaution et au besoin, utiliser des aspirateurs buccaux pour les transférer d'une cage à une autre.

Le régime alimentaire des adultes affecte leur longévité et leur fécondité. Ceux qui se nourrissent exclusivement de sang vivent plus longtemps que ceux dont le régime allie sucre et sang. On donne généralement aux femelles un repas de sang tous les 2 ou 3 jours. Les animaux de laboratoire utilisés pour nourrir les adultes (par ex. lapins, cobayes) doivent être tenus éloignés de l'insectarium. Il faut toujours vérifier que le coton hydrophile imprégné de solution sucrée à 10 % est placé dans la cage et le remplacer tous les jours.

Le maintien d'une humidité relative constante de 80 % (±10 %) est primordial pour la survie des adultes. On peut utiliser des injecteurs de vapeur, des humidificateurs ou des refroidisseurs évaporatifs. La température doit également rester stable, entre 25°C et 27°C.

Unité 10
La sensibilité aux insecticides et les tests biologiques en cônes

Objectifs de l'apprentissage

La résistance des moustiques vecteurs aux insecticides utilisés dans la lutte anti-vectorielle est un problème mondial et croissant, qui menace la pérennisation des programmes de lutte contre le paludisme. A l'issue de cette unité d'apprentissage, le participant saura comment effectuer les tests suivants :

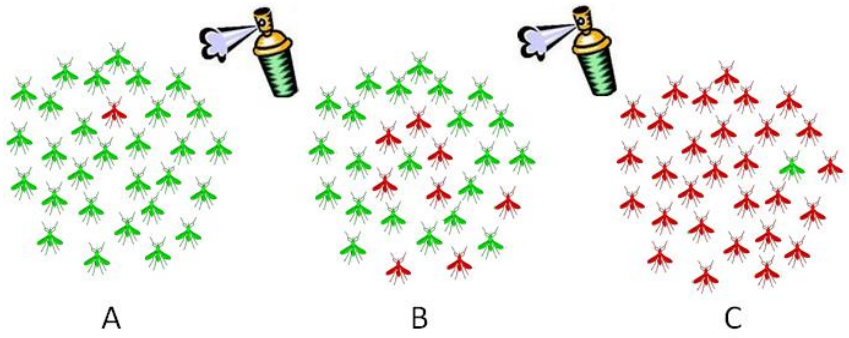
- **test de l'OMS permettant d'évaluer la sensibilité des vecteurs aux insecticides ;**
- **test biologique de l'OMS permettant d'évaluer l'efficacité résiduelle d'un insecticide sur des surfaces traitées par pulvérisation ;**
- **test biologique de l'OMS permettant d'évaluer l'efficacité résiduelle des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action.**

10.1 Pourquoi déterminer la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides ?

Si un vecteur est sensible à un insecticide, cela signifie qu'il sera tué quand il entre en contact avec celui-ci au dosage prescrit et employé dans l'intervention concernée (pulvérisations intra domiciliaires d'insecticide à effet rémanent, moustiquaires imprégnées d'insecticide ou larvicides). Une diminution de la sensibilité signifie que le vecteur devient de plus en plus tolérant à l'insecticide, jusqu'à un niveau où il lui est résistant.

Si un vecteur développe une résistance à un insecticide, cela signifie qu'il peut survivre à la dose qui l'aurait normalement tué et cela nuit à l'efficacité de l'intervention. Il est donc important de connaître le niveau de sensibilité du vecteur local aux insecticides utilisés dans l'intervention.

La résistance aux insecticides résulte de l'interaction de la pression sélective, de la variabilité génétique (mutation), du flux génétique et du cycle biologique de la population de moustiques (Fig. 24).



A. Les mutations génétiques qui confèrent aux moustiques une résistance aux insecticides se produisent généralement très lentement chez les populations naturelles ; B : sous la pression sélective de l'insecticide, les mutants vont mieux réussir à survivre et les moustiques de type sauvage (sensibles) vont mourir. C : après plusieurs générations de pression continue d'insecticide, les mutants résistants vont prévaloir dans les populations.

Figure 24. Sélection de la résistance aux insecticides chez les populations de vecteurs

10.2 Préparation de vecteurs pour des tests de sensibilité et évaluations biologiques en cônes

On utilise principalement deux méthodes pour préparer/obtenir les vecteurs en vue de tests biologiques :

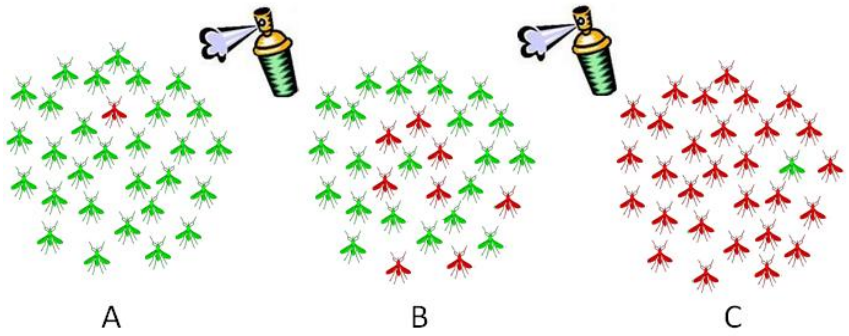
- Les larves peuvent être récoltées dans divers gîtes de reproduction (voir Unité 5). Elles sont ensuite élevées dans des conditions de laboratoire (voir Unité 9). Les nymphes sont alors transférées chaque jour dans des cages pour émergence des adultes. On nourrit les adultes avec une solution sucrée à 10% et on les conserve en cohortes de 3 à 5 jours après leur émergence.
- Une autre méthode consiste à capturer des femelles de moustiques gorgées de sang ou gravides, à l'aide des techniques d'échantillonnage d'adultes décrites dans l'Unité 6. Elles sont alors nourries sur avec une solution sucrée à 10 % jusqu'à la pondre des œufs (voir Unité 9) ; puis la génération F1 qui en résulte est élevée pour obtenir des adultes de 3 à 5 jours qui serviront pour les tests. On a besoin dans ce cas d'un minimum d'environ 50 femelles pour avoir suffisamment d'œufs et obtenir une variabilité génétique adéquate. Il est souvent très difficile d'obtenir un grand nombre d'*An. funestus* et d'*An. darlingi* femelles au stade d'oviposition (*c-à-d.* des femelles qui pondent des œufs en captivité).

10.3 Détermination de la sensibilité des moustiques adultes

Il existe deux méthodes standardisées qui permettent de déterminer la sensibilité des moustiques adultes aux insecticides. Ces deux méthodes mesurent uniquement la régression de la sensibilité aux insecticides dans les populations vectrices. Ce n'est pas une mesure directe de la résistance. Pour confirmer la résistance, une analyse supplémentaire est requise pour déterminer les mécanismes impliqués dans la réduction de la sensibilité.

Test biologique CDC en bouteille : Cette méthode est largement utilisée dans plusieurs pays ; on peut télécharger le protocole sur le site ; www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/bottle/index.htm .

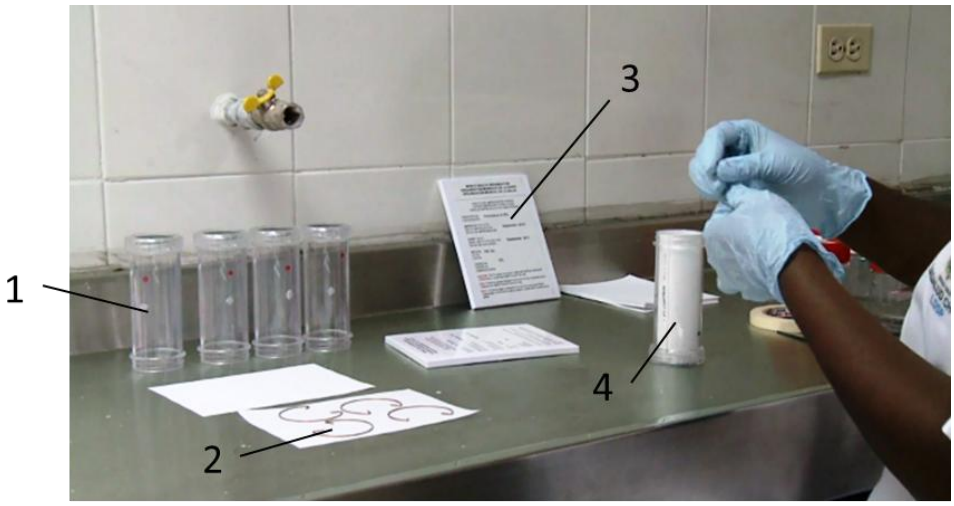
Test de l'OMS en tubes: Un protocole standardisé permettant d'évaluer la sensibilité des anophèles femelles est fournie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 1998). Les moustiques vecteurs d'une espèce donnée sont exposés dans tubes à essais spéciaux, contenant du papier filtre imprégné d'une concentration létale (dose discriminatoire) d'un insecticide donné dissout dans de l'huile.



1. Tubes témoins/tubes de conservation (point vert), 2. Tubes d'exposition (point rouge), 3. Plaques

Figure 25. Tubes OMS utilisés pour les tests de sensibilité

Le kit de tubes OMS contient deux tubes en plastique de 44 mm de diamètre et 125 mm de hauteur (Fig. 25). Chaque tube est muni en une extrémité d'un écran de 16 mailles. Un des tubes est marqué d'un point rouge et est utilisé comme « tube d'exposition » ; il est garni de papier filtre imprégné d'insecticide et maintenu en place avec deux anneaux en cuivre. L'autre tube, marqué d'un point vert, sert de « tube de observation » ; ses parois intérieures sont revêtues de papier ordinaire maintenu en place par deux anneaux en acier (Fig. 26).



1. Tubes d'exposition (point rouge), 2. Anneaux, 3. Boîte de papiers imprégnés, 4. Tube témoin (point vert)

Figure 26. Mise en place du papier imprégné dans le tube d'exposition

Le tube d'observation est connecté à une plaquette munie d'une ouverture de 20 mm de diamètre par lequel on introduit les moustiques à l'aide d'un aspirateur. Le tube d'exposition peut être vissé sur un des deux côtés par une plaque. Une cloison coulissante ouvre une voie de communication entre le tube d'exposition et le tube d'observation ; les moustiques sont doucement transférés dans le tube d'exposition pour les mettre en contact forcé avec l'insecticide. Puis, après l'exposition, les moustiques sont à nouveau transférés dans le tube d'observation.

Dans chaque essai, du papier filtre imprégné uniquement de l'huile utilisée pour dissoudre l'insecticide est placé dans un autre tube d'exposition (également marqué d'un point vert), ceci pour servir de témoin de test. Les étapes du test sont les suivantes :

- connecter le tube de observation sur la plaque ;
- transférer 15 à 25 moustiques dans chaque tube d'observation au travers de l'ouverture centrale. Les moustiques de test, nourris d'une solution sucrée, sont soigneusement prélevés des cages d'adultes à l'aide d'un aspirateur. On laisse les moustiques reposer 60 minutes dans les tubes d'observation ;
- connecter les tubes d'exposition (y compris le tube témoin) à chacun des tubes d'observation de l'autre côté de la plaque. Ouvrir la plaque et souffler délicatement pour faire passer les moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition ;
- Fermer la plaque, déconnecter les tubes d'observation et laisser les tubes d'exposition (ainsi que le tube témoin) contenant les moustiques debout pendant une heure (deux heures si on utilise du fénitrothion). Prendre note des moustiques morts à intervalles de 15 minutes au cours de la période d'exposition.
- A la fin de la période d'exposition, re transférer les moustiques dans le tube d'observation et les laisser debout pendant 24 heures. Placer du coton hydrophile

imbibé de solution sucrée sur tube munie d'un écran, puis placer les tubes dans une boîte en bois comportant de gros trous d'aération et recouverte d'une serviette humide. La température et l'humidité de la boîte doivent être contrôlées (25±2°C ; 75±10 %) ;

- 24 heures après l'exposition, compter les moustiques morts au contact de l'insecticide et ceux morts dans le tube témoin ;
- Si on utilise 25 moustiques par tube, il faudra en tester un minimum de 100 moustiques, soit quatre ou cinq répliques pour calculer le pourcentage de mortalité d'un insecticide ;
- Les taux de mortalité sont calculés comme suit :
  - **Mortalité dans le tube témoin :** C = (nbre de moustiques morts)/(nbre de moustiques testés) dans le tube témoin.
  - **Mortalité dans les tubes d'exposition** : E = nbre de moustiques morts)/(nbre de moustiques testés) dans les tubes d'exposition contenant de l'insecticide.
  - Si le taux de mortalité du tube témoin se situe entre 5 et 20 %, le taux de mortalité suite à l'exposition, E, est corrigé par la formule d'Abbott :

Taux de mortalité corrigé : $E' = [(E- C) / (100-C)] \times 100$

où E est la mortalité suite à l'exposition (non corrigée) exprimée en % et C est la mortalité du lot témoin exprimée en %.

Par exemple, si la mortalité du lot témoin C est de 10 % et la mortalité d'exposition brute E est de 40 %, la mortalité d'exposition corrigée est $[(40 – 10)/100 – 10)] * 100 = 33$ % .

- Si la mortalité du lot témoin est inférieure à 5 %, il n'est pas nécessaire de corriger E.
- Si la mortalité de contrôle est supérieure à 20 %, il faut annuler l'expérience.

Interprétation des résultats

- Un taux de mortalité situé entre 98 % et 100 % indique une sensibilité ;
- Un taux de mortalité situé entre 80 et 97 % suggère une résistance possible. Il est souhaitable d'entreprendre un échantillonnage supplémentaire et des tests approfondis pour reconfirmer ces niveaux de résistance dans la population vectrice testée ;
- Un taux de mortalité inférieur à 80 % indique une résistance.

Une analyse biochimique ou des méthodes moléculaires (PCR) peuvent permettre d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance détectée et faciliter ainsi la mise en place de mesures efficaces de gestion de la résistance.

10.4 Efficacité résiduelle d'insecticide sur des surfaces traitées par pulvérisations (OMS 1998, 2005)

L'efficacité rémanente d'un insecticide sur une surface traitée par pulvérisations est déterminée par des tests biologiques effectués avec des cônes. On vérifie la mortalité des l'espèce vectrice visée, exposée à la surface traitée, à plusieurs semaines ou plusieurs mois d'intervalle pendant la période après pulvérisation. Cette technique peut également permettre d'évaluer la qualité d'une opération de pulvérisation d'insecticides à effet rémanent et de déterminer l'efficacité rémanente de moustiquaires imprégnées d'insecticide.

Le kit de test biologique en cône OMS contient des cônes en plastique, du ruban adhésif éponge, un aspirateur ou tubes d'aspiration flexibles, un aspirateur ou des tubes d'aspiration normaux, du carton, des petits clous, un marteau, du coton hydrophile, des gobelets en papier couverts d'écrans, des élastiques, des feutres, une cage à moustiques, une boîte en bois munie de gros trous, des serviettes. Les cônes en plastique sont illustrés à la Fig. 27.

Figure 27. Test biologique de l'OMS à l'aide des cônes fixés sur un mur

La procédure du test sur le mur est la suivante :

- placer du ruban adhésif éponge le long des bords du cône en plastique ;
- le cône doit être fixé sur la surface pulvérisée à l'aide de ruban adhésif ou de clous. Les cônes sont fixés à trois hauteurs différentes (en bas, au milieu et en haut) ;
- du carton ne contenant pas d'insecticide est cloué au mur sur lequel sont fixés les cônes en plastique, ce carton sert de témoin ;
- placer dans chaque cône 10 moustiques d'un insectarium d'une souche anophèle parfaitement sensible et un morceau de coton hydrophile dans l'ouverture du cône. Utiliser un aspirateur/tube d'aspiration différent pour transférer les moustiques dans les cônes témoins ;

- Au bout d'une période d'exposition déterminée (généralement 30 minutes), retirer soigneusement les moustiques des cônes et on les transfère dans des gobelets en papier individualisés et étiquetés. Compter le nombre de moustiques morts ou assommés après la période d'exposition mais on n'y touche pas, car certains peuvent se réveiller plus tard.
- déposer du coton hydrophile imbibé sur les gobelets en papier, les placer dans la boîte en bois que l'on recouvre d'une serviette humide.
- Au bout de 24 heures, compter le nombre de moustiques morts et calculer le taux de mortalité dans les gobelets d'exposition et les gobelets témoins.
- Si le taux de mortalité témoin se situe entre 5 et 20 %, la mortalité due à l'exposition est corrigée à l'aide de la formule d'Abbott décrite plus haut. On annule les résultats si le taux de mortalité est supérieur à 20 %.
- Pour chaque type de mur testé, on reprend l'expérience sur différents murs de la même maison et aussi dans différentes maisons pour obtenir un échantillon représentatif.

Efficacité résiduelle d'insecticide en imprégnation de moustiquaires

La procédure de test biologique sur les moustiquaires imprégnées d'insecticide est similaire à celle appliquée sur les murs pulvérisés, sauf que les moustiques ne sont exposés que pendant trois minutes en lots de 5 par cône. Deux cônes sont placés de chaque côté et en haut de la moustiquaire accrochée sur un lit, à différentes hauteurs. Comme témoin, deux cônes sont placés sur une moustiquaire non imprégnée. Les cônes d'exposition sont attachés à la moustiquaire à l'aide d'élastiques (Fig. 28). Le test peut également être effectué en retirant la moustiquaire et en étalant une partie sur un morceau de carton.

Figure 28. Tests biologiques de l'OMS effectués à l'aide des cônes sur une moustiquaire imprégnée d'insecticide

Annexe I : Exemple de programme de formation et de programmation du cours d'entomologie de base destiné aux techniciens

Introduction

Le paludisme reste une importante cause de maladie et de mortalité infantile dans les régions tropicales du monde. Cette maladie suscite de grandes contraintes sur le développement économique et constitue un important facteur de pauvreté dans la plupart des pays où elle sévit à l'état endémique. Malgré une augmentation importante du financement de programmes de lutte antipaludique, les objectifs de réduction fixés par l'initiative Roll Back Malaria et divers programmes nationaux de lutte antipaludique n'ont pas encore été atteints dans bon nombre de pays. Ceci est dû en grande partie à un manque de capacité à générer des connaissances adéquates sur l'éco-épidémiologie locale de la maladie, en vue de d'orienter la mise en place et la gestion des programmes. La capacité de lutte anti-vectorielle et de surveillance entomologique reste notamment rudimentaire. Il est urgent que les programmes nationaux de lutte contre le paludisme forment leur personnel en qualité et en qualité pour les faire participer de façon efficace aux activités de lutte contre le paludisme.

Objectif de la formation

Ce cours a pour but de soutenir les efforts du programme national de lutte contre le paludisme (National Malaria Control Programme : NMCP) dans la formation d'une masse critique de personnel de niveau régional à la surveillance entomologique, en vue d'orienter les interventions de lutte anti-vectorielle. Cette formation permet au techniciens en entomologie d'acquérir des connaissances de base sur : (1) le rôle de la lutte contre les vecteurs du paludisme, (2) la biologie des vecteurs et la lutte anti-vectorielle, ainsi que des compétences sur l'application des protocoles standardisés pour la surveillance des vecteurs du paludisme.

Audience visée

Le cours s'adresse à un personnel de niveau régional dans les pays où le paludisme est endémique et qui est appelé à former les équipes chargées de la collecte et du rapportage des indicateurs entomologiques en appui aux stratégies de lutte anti-vectorielle. Ils devront avoir un niveau d'instruction secondaire ou un diplôme dans un domaine qui se prête à une formation en entomologie.

Structure du cours

Le cours est organisé en 10 unités. Chaque unité comporte une partie théorique, des travaux pratiques et des travaux dirigés (T-P). Le cours est conçu pour une durée de trois semaines, il peut être accélérer sur deux semaines en fonction des besoins du pays. Les deux premières semaines sont consacrées aux unités d'apprentissage. Les cours théoriques seront concentrées au cours de la première semaine, puis les travaux pratiques et les travaux dirigés au cours de la deuxième semaine. La troisième semaine sera consacrée à la démonstration des outils et des méthodes de lutte anti-vectorielle, à des séances de révision et de discussion générale, à l'évaluation du cours et celle des participants.

Evaluation du cours

Le cours commencera par un pré test qui permettra de raffiner la portée du cours pour mieux répondre aux objectifs de formation. A la fin du cours, un post test sera administré aux participants pour évaluer l'acquisition de nouvelles connaissances. Les participants répondront à un questionnaire confidentiel qui permettra d'évaluer la qualité des différentes composantes du cours.

Contenu du cours

Tous les domaines couverts dans le cadre de la formation sont présentés en détail dans le *Manuel de formation à l'intention des techniciens en entomologie* (niveau de base). Ce manuel servira de document de base pour orienter la formation. L'objectif et le contenu de chaque unité d'apprentissage sont présentés au Tableau A-1.

Programmation du cours

Un exemple de programmation du cours de base sur trois semaines est présenté au Tableau A-2. Cette programmation est flexible et dépendra de la logistique du lieu de formation et des besoins des participants (programmes nationaux).

Tableau A-1. Objectif et contenu des unités d'apprentissage

Unité	Intitulé	Objectif	Contenu	Classes
1	La lutte antipaludique et le rôle de l'entomologie	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants seront à même d'illustrer le rôle de la lutte anti-vectorielle dans les programmes de lutte contre le paludisme, les principaux outils disponibles pour la lutte anti-vectorielle et les principes de base de sa mise en place.	• Principes de base de la lutte antipaludique • Outils de la lutte anti-vectorielle • Lutte anti-vectorielle et principes à l'appui d'une bonne mise en place • Principes de base pour la planification d' interventions anti-vectorielles	Cours théoriques Travaux pratiques : Démonstration des principaux outils utilisés dans la lutte anti-vectorielle (moustiquaires, pulvérisations d'insecticide à effet rémanent, larvicides)
2	Biologie des vecteurs du paludisme	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants auront appris les principaux aspects du cycle de vie d'un moustique et les principales caractéristiques biologiques, écologiques et comportementales qui influencent la capacité d'un moustique à transmettre le paludisme.	• Cycle de vie des anophèles • Principales caractéristiques bioécologiques d'importance médicale	Cours théoriques Travaux pratiques : Démonstration des différents stades du cycle de vie dans l'insectarium
3	Anatomie et identification des moustiques	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants seront à même de distinguer morphologiquement les anophèles, qui sont les moustiques vecteurs du paludisme humain, par rapport aux culicinés qui ne transmettent pas le paludisme humain.	• Principales caractéristiques morphologiques des moustiques (*Diptera: Culicidae*) • Distinction entre anophèles (sous-famille des *Anophelinae*)et autres culicidés (sous-famille des *Culicinae*) aux stades immatures et adultes	Cours théoriques Travaux pratiques : Identification des principales caractéristiques distinctives des moustiques, identification morphologique des *Anophèles*.
4	Diversité des vecteurs du paludisme	Dans la plupart des régions où il sévit à l'état endémique, la transmission du paludisme est assurée par plusieurs espèces vectrices et, dans certains cas, par différentes sous-populations de moustiques. A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants auront acquis des connaissances sur la complexité des systèmes vectoriels.	• Distribution géographique des vecteurs du paludisme, diversité d'habitat et adaptation écologique • Concept des complexes d'espèces jumelles • Description du complexe *Anopheles gambiae* et du groupe *Anopheles funestus*	Cours théoriques Travaux pratiques : Introduction aux clés taxonomiques et leur emploi pour les adultes et les larves
5	Surveillance des moustiques (larves)	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants seront à même de procéder à des prélèvements larvaires dans le cadre d'études entomologiques visant la surveillance des moustiques.	• Importance des études larvaires • Diversité des gites larvaires et facteurs affectant la production d'adultes, méthodes d'échantillonnage, conservation et traitement des échantillons • Facteurs environnementaux communément observés • Traitement et analyse des données	Cours théoriques Travaux pratiques : Echantillonnage et identification des larves et des nymphes de moustiques
6	Surveillance des moustiques (adultes)	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants seront à même de procéder à des prélèvements d'adultes dans le cadre d'études entomologiques visant la surveillance des moustiques.	• Types d'études portant sur les moustiques • Méthodes de collecte de moustiques adultes (captures nocturnes/pose pour piqûre ; captures au pyrèthre ; capture au repos à l'extérieur ; captures par piège de sortie ; capture manuelle/par aspiration)	Cours théoriques Travaux pratiques : Echantillonnage d'adultes à l'aide de diverses techniques et traitement des échantillons

Unité	Intitulé	Objectif	Contenu	Classes
7	Préparation et conservation des échantillons de moustiques	A la fin de cette unité d'enseignement, les participants seront à même de choisir et d'appliquer les méthodes adaptées à la manipulation et à la conservation des échantillons de moustiques pour des analyses subséquentes en laboratoire.	• Principales techniques de laboratoire utilisées dans l'entomologie du paludisme (identification morphologique, dissections, tests ELISA, analyses cytogénétiques, analyse moléculaire basée sur ADN/ARN) • Préparation de moustiques en vue des différentes techniques • Matériel et équipement de base	Cours théoriques Cours pratiques : Préparation des échantillons de moustiques pour une analyse ELISA après un repas de sang ou pourune analyse moléculaire (ADN)
8	Indices de la transmission du paludisme et facteurs affectant la transmission	A la fin de cette unité d'enseignement, les participants auront acquis des connaissances sur les principaux facteurs affectant la transmission du paludisme. Ils auront appris comment obtenir des informations biologiques pour incriminer les vecteurs et calculer les indices de transmission. Ils seront également à même de calculer et d'interpréter les indices entomologiques et épidémiologiques de base utilisés pour établir les niveaux de transmission.	• Incrimination des moustiques vecteurs du paludisme (incrimination vectorielle) • Techniques d'incrimination vectorielle sélectionnées • Estimation des indices de transmission, notamment densités au repos à l'intérieur d'habitations, taux d'agressivité, préférences en matière d'hôtes; habit de repos des vecteurs après un repas de sang, préférences trophiques à l'intérieur et à l'extérieur d'habitations, taux d'inoculation entomologique (EIR) • Facteurs affectant la transmission du paludisme	Cours théoriques Travaux pratiques : Détermination de la digestion de sang et du state de développement ovarien, démonstration de la dissection de moustique et identification des glandes salivaires et des ovaires Travaux dirigés : Calcul des indices de transmission à l'aide des résultats tirés d'échantillons prélevés sur le terrain
9	Principes essentiels de l'élevage de colonies de moustiques en laboratoire	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants auront acquis des connaissances sur les conditions de mise en place d'un insectarium et les principales étapes permettant d'établir et de préserver des colonies de moustiques, ainsi que leur utilité dans la surveillance des vecteurs du paludisme.	• Fonctionnement de base d'un insectarium • Conditions générales d'élevage de moustiques : œufs, larves, nymphes et adultes	Cours théoriques Travaux pratiques : Collecte sur le terrain de moustiques sauvages pour établir une colonie dans un insectarium élémentaire
10	Sensibilité aux insecticides et tests biologiques effectués sur les murs	A la fin de cette unité d'apprentissage, les participants seront à même de procéder à des tests biologiques pour déterminer la sensibilité aux insecticides de populations de moustiques et de procéder à des tests biologiques pour évaluer l'efficacité rémanente de surfaces traitées à l'insecticide (murs et moustiquaires).	• Importance de l'étude de la sensibilité des vecteurs et de l'efficacité rémanente des insecticides • Tests de l'OMS : sensibilité des moustiques adultes aux insecticides • Tests de l'OMS : efficacité rémanente des insecticides pulvérisés sur des surfaces • CDC – test de sensibilité en bouteilles	Cours théoriques Travaux pratiques : Démonstration et pratique sur le terrain des tests de sensibilité et des tests biologiques

Tableau A-2. Programmation du cours (1ère semaine)

Horaires	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour	5e jour
9 h 00	Cérémonie d'ouverture	Principales interventions dans la lutte anti-vectorielle (Unité 1 ; T)	Incrimination des vecteurs (Unité 8 ; T)	Préparation et conservation des échantillons de moustiques (Unité 7 ; T)	Données et interprétation
9 h 30					
10 h 00	Objectifs du cours				
10 h 30	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*
11 h 00	Pré test	Principes de base de la planification d'une lutte antipaludique (Unité 1 ; T)	Etudes de moustiques (larves) (Unité 5 ; T)	Importance de l'étude de la sensibilité aux insecticides (Unité 10 ; T)	Etablissement et maintien de colonies de moustiques (Unité 9, T)
11 h 30					
12 h 00	*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*	
12 h 30					*Pause déjeuner*
13 h 00	Biologie des vecteurs du paludisme (Unité 2 ; T)	Identification des moustiques (Unité 3 ; T)	Etudes de moustiques (adultes) (Unité 6 ; T)	Type de tests disponibles auprès de l'OMS et de CDC (Unité 10 ; T)	
13 h 30					Collecte et transport de larves et de moustiques adultes pour peupler l'insectarium (Unité 9, P)
14 h 00				Pratique de tests biologiques de l'OMS, tests effectués avec des cônes et/ou tests CDC effectués en bouteilles (Unité 10, P)	
14 h 30	Principes de base de la lutte antipaludique (Unité 1 ; T)	Diversité des vecteurs du paludisme (Unité 4 ; T)			
15 h 00					*Pause café*
15 h 30	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	Procédures standard pour le maintien d'une colonie (Unité 9, T-P)
16 h 00	Le rôle de l'entomologie dans la lutte contre les vecteurs du paludisme (Unité 1 ; T)	Diversité des vecteurs du paludisme (Unité 4 ; T)	Estimation des paramètres de transmission du paludisme (Unité 8 ; T)	Pratique de tests biologiques de l'OMS, tests effectués avec des cônes et/ou tests CDC effectués en flacon (Unité 10, P)	
16 h 30					
17 h 00					

T : cours théorique ; T-P : travaux dirigés ; P :travaux pratiques

Tableau A-2. Programmation du cours (2e semaine)

Horaires	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour	5e jour	6e jour
6 h 00		Travaux de terrain (identification des gites larvaires et échantillonnage de larves) (Unité 5, P)		Collecte par pulvérisation au pyrèthre (Unité 6, P)		
8 h 00						
8 h 30				Traitement des moustiques (Unités 3&7, P)		
9 h 00	Organisation d'activités sur le terrain et matériel de base (Unités 5 & 6, T-P)		Traitement d'échantillons NBC et LTC (Unités 3&7, P)		Etude larvaire (Unité 5, P)	Traitement d'échantillons NBC et LTC (Unités 3&7, P)
9 h 30						
10 h 00				Collecte par fenêtre-piège et ORC (Unité 6, P)		
10 h 30	*Pause café*					*Pause café*
11 h 00	Habitudes de développement et contrôle des larves (Unités 1&2, T)	Identification des moustiques (larves) (Unité 3, P)		Pause déjeuner		Traitement d'échantillons NBC et LTC (Unités 3&7, P)
11 h 30						
12 h 00	*Pause déjeuner*		*Pause déjeuner*			
12 h 30		*Pause déjeuner*			*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*
13 h 00	Rapportage, gestion et utilisation des données (Unités 5&6, T)		Calcul des paramètres de transmission du paludisme (Unité 8, P)			
13 h 30		Identification des moustiques (adultes) (Unité 3, P)		Traitement des moustiques (Unités 3&7, P)	Identification des moustiques (larves) (Unité 3, P)	
14 h 00						Calcul des paramètres de transmission du paludisme (Unité 8, P)
14 h 30						
15 h 00	*Pause café*					
15 h 30	Identification des moustiques (Unités 3&4, P)		*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	
16 h 00		*Pause café*	Calcul des paramètres de transmission du paludisme (Unité 8, P)	Analyse et traitement des données (Unité 8, P)	traitement des données (Unité 8, P)	*Pause café*
16 h 30		Préparation aux captures nocturnes sur volontaires et à la par -pièges lumineux (Unité 6, P)			Préparation aux captures nocturnes sur volontaires et à la par pièges lumineux (Unité 6, P)	Calcul des paramètres de transmission du paludisme (Unité 8, P)
17 h 00			Préparations pour PSC (matin suivant) (Unité 6, P)			
17 h 30		*Dîner*			Dîner	
19 h 00		Captures nocturnes sur volontaires et par pièges lumineux NBC (Unité 6, P)			Captures nocturnes sur volontaires et par pièges lumineux NBC (Unité 6, P)	
22 h 00						

T : cours théorique ; T-P : cours théorique-pratique ; P : cours pratique

Tableau A-2. Programmation du cours (3e semaine)

Horaires	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour
9 h 00	Pratique de tests biologiques de l'OMS (Unité 10, P)	Démonstration d'outils/méthodes de lutte anti-vectorielle	Révision des connaissances théoriques	Evaluation des participants (examen)
9 h 30				
10 h 00				
10 h 30	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*
11 h 00	Pratique de tests biologiques de l'OMS (Unité 10, P)	Démonstration d'outils/méthodes de lutte antivectorielle	Révision des connaissances théoriques	Evaluation du cours
11 h 30				
12 h 00				
12 h 30	*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*	*Pause déjeuner*
13 h 00				
13 h 30	Pratique de tests CDC effectués en bouteilles (Unité 10, P)	Démonstration d'outils/méthodes de lutte anti-vectorielle	Discussion sur les travaux pratiques	Evaluation du cours
14 h 00				
14 h 30				Cérémonie de clôture
15 h 00				
15 h 30				
16 h 00	*Pause café*	*Pause café*	*Pause café*	
16 h 30	Pratique de tests biologiques en cônes (Unité 10, P)	Démonstration d'outils/méthodes de lutte anti-vectorielle	Discussion sur les travaux pratiques	
17 h 00				

T : cours théorique ; T-P : travaux dirigés ; P : Travaux pratiques

Annexes II :Exemples de formulaires de collecte de données en vue des études sur les moustiques aux stades larvaires et adulte

A. FORMULAIRE DE COLLECTE DE DONNÉES SUR LES LARVES

A.1. Identification du site de collecte

Région/district..... **Localité**.....

Coordonnées géographiques :

- **Latitude**.....
- **Longitude**.....

A.2. Caractéristiques du gîte larvaire

Type

- **Permanent** ☐ **Semi-permanent** ☐ **Temporaire** ☐

Origine de l'eau (*par ex.* pluie, rivière, lagune, artificielle).....

Nature de la collection d'eau (*par ex.* flaque, rizière, fossé).....

Caractéristiques de l'eau (*par ex.* claire, saumâtre, polluée, couleur sombre).....

- **Température**..... **pH**.....

Exposition aux rayons du soleil

- **Ombragé** ☐ **Partiellement ombragé** ☐ **Ensoleillé** ☐

Présence de végétation (émergente, submergée, flottante).

- **Emergente** ☐ **Submergée** ☐ **Flottante** ☐

A.3. Description de l'échantillonnage

Durée d'échantillonnage (min) ..... **Nombre de prélèvements** .....

Présence de larves

- **Anophèles** ☐ **Culicidés** ☐ **Négatif** ☐

A.4. Observations

.....

.....

Date..... **Heure de collecte**.....

Nom de l'enquêteur.....

B. FORMULAIRE DE COLLECTE DE DONNÉES SUR LES ADULTES

B.1. Identification du site de collecte

Région/district..... **Localité**.....

Coordonnées géographiques :

- **Latitude**.....
- **Longitude**.....

B.2. Type de collecte

Capture sur volontaire **:** **A l'intérieur** ☐ **A l'extérieur** ☐

Capture au repos : **A l'intérieur** ☐ **A l'extérieur** ☐

Capture au pyrèthre ☐ **Capture au piège de sortie** ☐

Autre.....

B.3. Caractéristiques du site de collecte

Collecte à l'intérieur des habitations

- **Type de maison et matériaux de construction**.....
- **Nombre de chambres**..... **Nombre de compartiments**.....
- **Nombre de personnes ayant passé la nuit précédente dans la maison :**
  - **Avec une moustiquaire**..... **Sans moustiquaire**.....
- **Type de moustiquaire**
  - **Non-imprégnée** ☐ **Imprégnée** ☐ **MILDA** ☐
- **Date de la dernière pulvérisation de la maison avec un insecticide**.....

Type et caractéristique de la capture effectuée à l'extérieur (par ex. abris pour animaux, végétation).....
.....

B.4. Description de l'échantillonnage

Heure de la collecte..... **Durée**..... **Nbre de captureurs**.....

Présence de moustiques adultes

- **Anophèles** ☐ **Culicidés** ☐ **Négatif** ☐

A.4. Observations

.....
.....

Nom de l'enquêteur..... **Date**.....