



République du Bénin
MINISTÈRE DE LA SANTÉ

Direction de la Recherche et de la Formation

Centre de Recherche Entomologique de Cotonou 06 BP 2604 Tél : 21 33 08 25

Rapport de formation de 3 stagiaires Guinéens sur les Techniques Entomologiques du Paludisme

Par

Dr Razaki OSSE & Pr. Martin AKOGBETO

Mai 2015



1. Contexte et justification

Malgré beaucoup d'efforts, le paludisme demeure un problème de santé publique grave en Afrique. En République de Guinée, malgré les efforts déployés par le Gouvernement et ses partenaires au développement dans la lutte contre le paludisme, cette affection constitue l'un des problèmes majeurs de santé publique où elle sévit à l'état d'endémie stable à recrudescence saisonnière longue (6 à 8 mois : mai à décembre) dans l'ensemble des régions et districts sanitaires du pays. Selon les statistiques du Ministère de la Santé, le paludisme représente la première cause de consultation dans les formations sanitaires (33,8%), la première cause d'hospitalisation (31%) et la première cause de décès en milieu hospitalier (14,2%). Toute la population guinéenne est exposée au risque du paludisme mais surtout les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans sont les couches les plus vulnérables.

Plasmodium falciparum est responsable de 92% des cas de paludisme (EDS-IV/MICS, 2012). Sa transmission est presque permanente durant toute l'année avec des pics saisonniers en début de saison de pluie et en début de saison sèche, occasionnée par les vecteurs majeurs tels que *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. arabiensis* (Baldé *et al.*, 2001). Parmi les facteurs favorisant cette transmission, on peut citer entre autres l'écosystème très favorable au développement des vecteurs et l'ignorance des communautés sur certaines bonnes pratiques de la lutte anti vectorielle. Par ailleurs, il faut noter que très peu d'études récentes ont été réalisées sur les vecteurs en Guinée.

Dans le cadre de l'exécution de son plan d'action opérationnel 2014 - 2015, le ministère de la santé à travers le PNLP en partenariat avec le PMI/USAID et le CRS a planifié au titre du renforcement des capacités de l'unité lutte anti vectorielle, la formation de trois (03) cadres sur les techniques entomologiques de base du paludisme et la biologie moléculaire. Cette formation s'est déroulée du 1^{er} février au 1^{er} avril 2015 au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) au Bénin. Cette formation a permis de renforcer non seulement les compétences nécessaires des agents de santé sur les notions d'entomologie de base du paludisme et contrôle des vecteurs, mais aussi les capacités de mise en œuvre des activités de lutte antivectorielle du PNLP.

2. But et objectifs de la formation

2.1. But

Cette formation vise à apporter un appui technique aux cadres de l'Unité LAV du PNLP par le renforcement de leurs capacités sur les techniques entomologiques et de biologie moléculaire d'étude des vecteurs du paludisme.

2.2. Objectifs

Au terme de la formation, chaque stagiaire est capable de:

- ✓ organiser et exécuter les activités d'échantillonnage des moustiques (larves et adultes);
- ✓ élever les moustiques à l'insectarium ;
- ✓ identifier morphologiquement les moustiques ;
- ✓ déterminer l'âge physiologique des vecteurs (longévité);
- ✓ réaliser les tests de sensibilité des vecteurs aux insecticides ;
- ✓ réaliser les tests d'efficacité des matériaux imprégnés d'insecticide (MIILD et murs traités) ;
- ✓ évaluer l'efficacité des MIILD et autres matériaux traités à l'insecticide;
- ✓ réaliser les techniques ELISA sur les moustiques (ELISA CSP et ELISA repas de sang) ;
- ✓ réaliser les tests biochimiques pour la recherche des enzymes de détoxification (oxydase, estérase et GST) ;
- ✓ réaliser la PCR (espèces, forme moléculaire, Kdr et Ace-1)

3. Méthodologie de travail

L'approche méthodologique utilisée au cours de cette formation était basée sur la méthode participative active, qui a été soutenue par les techniques d'animation suivantes : exposés/débats, projection des présentations en power point, supports pédagogiques, lecture dirigée, discussions, questions/réponses, travaux pratiques aux laboratoires et activités de terrain à Akron et à Dangbo. Les travaux se sont déroulés suivant le chronogramme mis en annexe.

Par ailleurs, un échantillonnage des moustiques collectés en Guinée a été fait pour subir les analyses biochimiques et moléculaires au laboratoire (tableau I).

A cet effet, pour détecter la présence de sporozoïtes au niveau des têtes-thorax des moustiques, la technique ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) décrite par Wirtz *et al.* (1987) a été utilisée. Aussi, les origines de repas de sang des femelles d'anophèles nourries collectées par pyrèthre dans certaines localités de la Guinée ont été déterminés en utilisant un

dosage immuno-enzymatique direct (ELISA) suivant la méthode de Beier *et al.* (1988) à l'aide des anticorps humains, de bovins, de mouton, de poulet et de porc. Ensuite, les stagiaires ont été initiés au test biochimique d'identification des oxygénases, des estérases non spécifiques et des GST, impliquées dans la résistance métabolique de *Anopheles gambiae s.l.* aux insecticides selon la technique décrite par Hemingway (1998). Enfin, les PCR espèce, formes moléculaires, *kdr Leu-Phe* et *Ace-I^R* ont été respectivement réalisées selon les protocoles décrits par Scott *et al.* (1993), Favia *et al.* (1997), Martinez-Torres *et al.* (1998) et Weill *et al.* (2004).

Tableau I: Effectifs des moustiques des différentes localités de Guinée analysés à la PCR (A), à l'ELISA CSP (B) et à l'ELISA repas de sang (C).

A)

Sites	Localités	CAH	PL	Pyrèthre	Test	Total
Kissidougou	Gbangbadou	40	27	23	25	115
	Kérédou	40	5	25	25	95
	Tongbèkoro	40	7	27	25	99
Fraranah	Balayani	40	12	25	25	102
	Foulayah	40	10	26	25	101
	Tindo	40	17	25	25	107
Boké	Guilèrè			1		1
	Djougou	9				9
	Kaboye	8			57	65
Labé	Banty		4			4
	Tountourou		6			6
Total		257	88	152	207	704

CAH : capture sur appât humain ; PL : piège lumineux.

B)

Sites	Localités	CAH	PL	Pyrèthre	Total
Kissidougou	Gbangbadou	67	39	23	129
	Kérédou	78	5	28	111
	Tongbèkoro	56	7	45	108
Fraranah	Balayani	70	12	27	109
	Foulayah	69	10	40	119
	Tindo	67	17	39	123
Boké	Guilèrè			1	1
	Djougou	9			9

	Kaboye	8		8
Labé	Banty		4	4
	Tountourou		6	6
Total		407	90	202
			202	727

C)

Sites	Localités	Pyrèthre
Kissidougou	Kérédou	17
	Tongbèkoro	24
Faranah	Balayani	8
	Foulayah	4
Total		53

4. Résultats

Après analyse des résultats des moustiques traités aux ELISA (CSP et repas de sang) et à la PCR (espèces, formes moléculaires, *Kdr* et *Ace-1*), il ressort ce qui suit :

4.1 ELISA CSP :

Au total, 732 *An. gambiae* s.l. ont été soumis à l'ELISA CSP parmi lesquels 10 ont été positifs au *Plasmodium falciparum*. L'indice sporozoïtique moyen (Is) est de 1,37%. La répartition des moustiques traités par localité est présentée dans le tableau II :

Tableau II : Indice sporozoïtique de *An. gambiae* s.l. observé dans les localités de la Guinée.

Sites	Localités	N testé	CS+	%CS+
Kissidougou	Gbangbadou	129	5	3,88
	Kérédou	111	2	1,80
	Tongbèkoro	113	2	1,77
Faranah	Balayani	109	1	0,92
	Foulayah	119	0	0
	Tindo	123	0	0
Boké	Guilèrè	1	0	0
	Djoumaya	9	0	0
	Kaboye	8	0	0
Labé	Banty	4	0	0
	Tountourou	6	0	0
Total		732	10	1,37

4.2 Origine du repas de sang

Sur les 53 anophèles gorgés passés à l'ELISA repas de sang dont 41 de Kissidougou et 12 de Faranah, la plupart ont pris leur repas de sang sur l'homme (60,4%) dans toutes les localités (tableau III). Il faut noter que l'identification de chaque origine de repas de sang a été faite en double exemplaire.

Tableau III : Origines des repas de sang des femelles d'*An. gambiae* collectés par pyrèthre à Kissidougou et à Faranah en 2014

Sites	Localités	Total testé	Origines du repas de sang			
			N Homme (%)	N Boeuf (%)	N Mouton (%)	N Porc (%)
	Kérédou	17	12 (70,6)	0	0	0
Kissidougou	Tongbèkoro	24	14 (58,3)	0	0	0
Faranah	Balayani	8	5 (62,5)	0	0	0
	Foulayah	4	1 (25)	0	0	0
Total		53	32 (60,4)	0	0	0

4.3 Identification des espèces et formes moléculaires au sein du complexe *An. gambiae* et caractérisation moléculaire des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1*

Un total de 704 femelles d'*An. gambiae* provenant des différentes localités de la Guinée ont été analysés à la PCR espèces, formes moléculaires, *Kdr* et *Ace-1*. Les résultats des tests moléculaires effectués sont présentés dans les tableaux IV et V. *An. gambiae* s.s (100%) est la seule espèce rencontrée dans les différentes localités traitées. Les deux formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. ont été identifiées, avec une prédominance de la forme S (88,41%, n=618) dans les différentes localités sauf dans les localités de Guiléré et de Kaboyé où la forme M est la seule forme présente (tableau IV).

Par ailleurs, la mutation *Kdr* est le principal mécanisme de résistance identifié dans toutes les zones. La fréquence allélique de cette mutation a varié de 25% à Banty à 98% à Gbangbadou (tableau V). Quant à la mutation *Ace-1*, elle a été observée dans 8 localités sur les 12 traitées avec une fréquence allant de 1% à Tindo à 6% à Balayani et à Djoumaya (tableau V).

Tableau IV : Répartition des espèces et formes moléculaires de *An. gambiae* s.l issues des localités de la Guinée.

Sites	Localités	N testé	Espèces		Formes moléculaires	
			<i>An. gambiae</i> s.s.	<i>An. arabiensis</i>	M	S
Kissidougou	Gbangbadou	115	115	0	5	110
	Kérédou	95	95	0	10	85
	Tongbèkoro	94	94	0	9	85
Faranah	Balayani	102	102	0	4	98
	Foulayah	101	101	0	22	79
	Tindo	107	107	0	12	95
Boké	Guilèrè	1	1	0	1	0
	Djoumaya	9	9	0	2	7
	Kaboye	8	8	0	8	0
	Eglise	57	57	0	8	49
Labé	Banty	4	4	0	0	4
	Tountourou	6	6	0	0	6
Total		699	699	0	81	618

Tableau V : Répartition des fréquences *Kdr* et *Ace-1* de *An. gambiae* s.l issues des localités de la Guinée.

Sites	Localités	N testé	<i>Kdr</i>				<i>Ace-1</i>			
			RR	RS	SS	F (<i>Kdr</i>)	RR	RS	SS	F (<i>Ace-1</i>)
Kissidougou	Gbangbadou	115	110	5	0	0,98	0	11	104	0,05
	Kérédou	95	90	5	0	0,97	0	7	88	0,04
	Tongbèkoro	94	88	6	0	0,97	0	3	91	0,02
Faranah	Balayani	102	86	9	7	0,89	0	13	89	0,06
	Foulayah	101	65	20	16	0,74	0	7	94	0,03
	Tindo	107	76	18	13	0,79	0	3	104	0,01
Boké	Guilèrè	1	0	0	1	0	0	0	1	0
	Djoumaya	9	5	3	1	0,72	0	1	8	0,06
	Kaboye	8	2	3	3	0,44	0	0	8	0
	Eglise	57	45	8	4	0,86	0	6	51	0,05
Labé	Banty	4	0	2	2	0,25	0	0	4	0
	Tountourou	6	4	2	0	0,83	0	0	6	0
Total		699	571	81	47	0,87	0	51	648	0,04

5. Conclusion

Les objectifs du stage sont atteints. Les trois stagiaires se sont appliqués à maîtriser l'ensemble des techniques entomologiques selon les conditions de l'art. Ils ont fait preuve de beaucoup d'endurance et de discipline. Au cours de leur stage, les trois stagiaires se sont initiés aux techniques de biologie moléculaires sur leurs propres anophèles (moustiques capturés en Guinée), ce qui leur a permis de retourner en Guinée avec leurs résultats. Concernant ces résultats, les données brutes sont montrées ici. Nous attendons des compléments d'informations de la part du PNLP avant de les commenter et d'aider le PNLP à les publier dans un journal international.

Annexe : Agenda de la formation

Sous la direction du Professeur Martin AKOGBETO

Périodes	Activités	Encadreurs
02 au 06 février	<ul style="list-style-type: none">- Cours sur Module Paludisme : Généralités sur les moustiques, les anophèles vecteurs du paludisme, Morphologie des moustiques, Anatomie des moustiques, Classification des moustiques, Bioécologie des anophèles, Récolte des anophèles sur le terrain, Analyse des échantillons récoltés, notion de paludométrie)- Travaux pratiques (TP) sur l'identification des larves et adultes des différents genres de moustiques	Prof Martin Akogbéto Dr Gil Padonou Dr Razaki Ossè
09 au 13 février	<ul style="list-style-type: none">- TP élevage des moustiques à l'insectarium- Prospection larvaire+ élevage des larves prospectées- TP sur la détermination de l'âge physiologique des vecteurs	Dr Gil Padonou Dr Razaki Ossè
16 au 20 février	<ul style="list-style-type: none">- TP test de sensibilité des vecteurs aux insecticides- TP test d'efficacité des matériaux imprégnés (moustiquaires, murs)- TP test en tunnel	Dr Rock Aikpon Rodrigue AGOSSA (Msc)
23 au 27 février	<ul style="list-style-type: none">- Capture de moustiques à Akron ou Itassoumba (piège fenêtre, spray, appât humain)- TP identification morphologique des moustiques capturés au laboratoire et utilisation d'une clé de détermination- TP dissection des ovaires des anophèles capturés- TP dissection des têtes-thorax et conservation des anophèles	Dr Gil Padonou Dr Razaki Ossè Dr Arthur Sovi
02 au 10 mars	Cours théoriques et pratiques sur les techniques de réalisation des tests ELISA sur les moustiques de Guinée (ELISA CSP et ELISA Blood meal)	Dr Razaki Ossè
11 au 18 mars	Cours théoriques et pratiques sur les tests biochimiques pour la recherche des enzymes de détoxification	Dr Razaki Ossè
19 mars au 01 avril	<ul style="list-style-type: none">- Cours théoriques et pratiques sur la réalisation des PCR espèces, formes moléculaires, Kdr et Ace-1- Rédaction du rapport de stage	Dr Razaki Ossè