



LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Durée d'incubation extrinsèque suivant les espèces plasmodiales et la température | 7 |
| Tableau 2 : Données climatiques..... | 13 |
| Tableau 3: Liste des plantes ayant les capacités insecticides..... | 45 |
| Tableau 4: liste des plantes codées et leur lieu de collecte respective | 46 |
| Tableau 5: Rendement de ces extractions éthanoliques..... | 48 |
| Tableau 6: Rendement des extractions hexaniques et des fractions aqueuses | 49 |
| Tableau 7 : Effectif total de moustiques élevés en insectarium | 49 |
| Tableau 8: Test de sensibilité sur les produits de référence OMS | 50 |
| Tableau 9: Test de sensibilité sur les extraits bruts..... | 51 |
| Tableau 10: Test de sensibilité sur ST 669 après partage liquide/liquide | 51 |
| Tableau 11: Test de sensibilité sur ST 669 après partage liquide/liquide | 52 |
| Tableau 12: Test de sensibilité sur la plante PKT (extrait brut)..... | 53 |
| Tableau 13: Test de sensibilité de la plante PKT après partage liquide/liquide | 53 |
| Tableau 14: Test de sensibilité de la plante RDO II: extrait hexanique..... | 54 |
| Tableau 15: Répartition par espèces des moustiques capturés à Beforona | 55 |
| Tableau 16: Répartition par espèces des moustiques collectés à Marozevo | 56 |
| Tableau 17: Répartition par espèces des moustiques collectés à Soa..... | 57 |
| Tableau 18: Nombre de piqure reçue par homme et par nuit (PHN) | 58 |
| Tableau 19: Taux d'agressivité d' <i>An. funestus</i> dans les sites étudiés | 59 |
| Tableau 20 : Taux de parité et longévité d' <i>An. gambiae s.l.</i> | 60 |
| Tableau 21: Taux de parité et longévité d' <i>An. funestus</i> | 62 |
| Tableau 23 : Répartition des moustiques capturés au repos à l'intérieur des habitations humaines | 67 |
| Tableau 24: Densité par case mensuelle d' <i>An. gambiae s.l.</i> | 68 |
| Tableau 25: Densité par case d' <i>An. gambiae s.l.</i> à Marozevo avant et après épandage | 70 |
| Tableau 26 :Densité par case d' <i>An. gambiae s.l.</i> à Soa avant et après l'épandage .. | 71 |
| Tableau 27 : Densité par case mensuelle d' <i>An. funestus</i> | 72 |
| Tableau 28 : Densité par case d' <i>An. funestus</i> à Marozevo avant et après épandage | 73 |



LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> | 8 |
| Figure 2 : Cycle d'un moustique genre <i>Anopheles</i> | 8 |
| Figure 3 : Fivondronana de Moramanga | 17 |
| Figure 4 : Commune Rurale de Beforona..... | 18 |
| Figure 5 : Appareil de Soxlhet et ses accessoires | 21 |
| Figure 6 : Test de sensibilité des moustiques | 28 |
| Figure 7 : Test de sensibilité au LBPP | 28 |
| Figure 8 : Aile d' <i>An. gambiae s.l.</i> | 32 |
| Figure 9 : Aile d' <i>An. funestus</i> | 32 |
| Figure 10 : Pattes d' <i>An. gambiae s.l.</i> | 32 |
| Figure 11 : Palpe d' <i>An. gambiae s.l.</i> | 32 |
| Figure 12 : Palpe d' <i>An. funestus</i> | 32 |
| Figure 13: Dissection des ovaires | 36 |
| Figure 14: Evolution des trachéoles ovariennes des Anophèles..... | 36 |
| Figure 15 : Photo d'un pulvérisateur à main à pression préalable | 39 |
| Figure 16 : Vue éclatée d'un pulvérisateur à main à pression préalable | 39 |
| Figure 17 : Répartition du jet et distance par rapport au mur | 40 |
| Figure 18 : Méthode de pulvérisation des insecticides sur le mur..... | 40 |
| Figure 19 : Rythme d'agressivité nocturne d' <i>An. gambiae s.l.</i> dans les trois sites d'études | 64 |
| Figure 19a - Beforona | 64 |
| Figure 19b - Marozevo..... | 64 |
| Figure 19c - Soa..... | 64 |
| Figure 20 : Rythme d'agressivité nocturne d' <i>An. funestus</i> dans la zone | 66 |
| Figure 20a - Beforona | 66 |
| Figure 20b - Marozevo..... | 66 |
| Figure 20c – Soa | 66 |
| Figure 21: Evolution d' <i>An. gambiae s.l.</i> en faune résiduelle au cours des mois de capture | 68 |
| Figure 22 : Evolution d' <i>An. funestus</i> en faune résiduelle au cours des mois de capture | 72 |



LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|-----|
| Annexe I : Les faciès épidémiologiques du paludisme à Madagascar..... | I |
| Annexe II : Calcul de la CL50 et CL90 | II |
| Annexe III : Tableau montrant le rythme d'agressivité nocturne des espèces vectrices..... | III |



LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--------------------|---|
| ADRA | Adventist Development and Relief Agency |
| °C : | Degré Celsius |
| CAID : | Campagne Aspersión Intra-domiciliaire de DDT |
| CHD II : | Centre Hospitalier de District niveau II |
| CL ₅₀ : | Concentration Létale tuant 50% des moustiques testés |
| CL ₉₀ : | Concentration Létale tuant 90% des moustiques testés |
| CNARP : | Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques |
| CR : | Commune Rurale |
| CSB II : | Centre de Santé de Base niveau II |
| CSP | Circum-Sporozoite |
| DDT : | Dichloro-Diphényl-Trichloréthane |
| DPC | Densité par Case |
| Eff | Effectif |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| EPP | Ecole Primaire Publique |
| Ext | Extérieur |
| F@des: | Fond d'Appui au Développement de l'Enseignement |
| Fiv.: | Supérieur Fivondronana |
| HTC: | Hautes terres Centrales |
| Int | Intérieur |
| IPM | Institut Pasteur de Madagascar |
| LBPP: | Laboratoire de Biologie des Populations Parasitaires |
| LDI | Landscape Development Intervention |
| ma ou PHN: | Taux d'agressivité ou piquêre par homme par nuit |
| OMS: | Organisation Mondiale de la Santé |
| ONG | Organisation Non Gouvernementale |
| OPID: | Opération de Pulvérisation Intra-domiciliaire de DDT |
| P.: | <i>Plasmodium</i> |
| s.l.: | <i>sensu lato</i> |
| SLP | Service de Lutte contre le Paludisme |
| s.s.: | <i>sensu stricto</i> |



T : Température
TE : Taux d'endophagie



SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| I. GENERALITES | 4 |
| I.1. Parasite : genre <i>Plasmodium</i> | 4 |
| I.2. Systématique..... | 5 |
| I.3. Cycle de développement..... | 5 |
| I.3.1. Cycle asexué chez l'homme----- | 5 |
| I.3.2. Cycle sexué chez le moustique femelle----- | 6 |
| I.4. Moustique : genre <i>Anopheles</i> | 9 |
| I.4.1. Systématique ----- | 9 |
| I.4.2. Cycle de développement ----- | 9 |
| I.4.3. Stade pré-imaginal ----- | 10 |
| I.4.4. Stade imaginal ----- | 10 |
| I.4.5. Notion de gîte larvaire ----- | 11 |
| II. PRESENTATION DE LA LOCALITE D'ETUDE..... | 12 |
| II.1. Climat | 13 |
| II.2. Zone d'étude (Beforona, Marozevo et Soa) | 14 |
| II.2.1. Topographie ----- | 14 |
| II.2.2. Végétation ----- | 14 |
| II.2.3. Peuplement et ressources ----- | 14 |
| II.2.3.1. Site 1: Beforona ----- | 15 |
| II.2.3.2. Site 2: Marozevo | 15 |
| II.2.3.3. Site 3: Soa | 16 |
| III. MATERIELS ET METHODES | 19 |
| III.1. Recherche bibliographique et liste des plantes à vertus insecticides... | 19 |
| III.2. Collecte des plantes..... | 19 |
| III.3. Extraction chimique | 19 |
| III.3.1. Matériels ----- | 20 |
| III.3.2. Méthodes ----- | 21 |
| III.3.2.1. Extraction alcoolique | 21 |
| III.3.2.2. Extraction liquide-liquide | 22 |



| | |
|---|-----------|
| III.3.2.3. Extraction de Soxhlet | 22 |
| III.4. Collecte et élevage des moustiques | 23 |
| III.4.1. Matériels de climatisation ----- | 23 |
| III.4.2. Méthodes ----- | 23 |
| III.4.2.1. Elevage et alimentation | 24 |
| III.4.2.2. Estimation de la durée des différents stades | 24 |
| III.4.2.3. Rendement | 25 |
| III.5. Test de sensibilité des moustiques aux extraits de plantes..... | 25 |
| III.5.1. Matériels ----- | 25 |
| III.5.2. Méthode ----- | 26 |
| III.5.2.1. Test de sensibilité des adultes de moustiques | 26 |
| III.5.2.2. Calcul des concentrations létales | 26 |
| III.6. Travaux sur le terrain à Beforona, Marozevo et Soa | 29 |
| III.6.1. Echantillonnage ----- | 29 |
| III.6.1.1. Capture de nuit sur appâts humains | 29 |
| III.6.1.2. Capture matinale en faune résiduelle | 30 |
| III.6.1.3. Identification des espèces vectrices | 30 |
| III.6.2. Traitement des moustiques sur le terrain ----- | 33 |
| III.6.2.1. Conservation du matériel collecté | 33 |
| III.6.2.2. Dissection des ovaires | 34 |
| III.6.3. Epandage ou pulvérisation intra-domiciliaire ----- | 37 |
| III.7. Etude d'impact des insecticides..... | 41 |
| III.7.1. Effet du traitement ----- | 41 |
| III.7.2. Analyse statistique ----- | 41 |
| III.7.3. Procédure de calcul ----- | 42 |
| III.7.4. Interprétation des résultats ----- | 43 |
| IV. RESULTATS | 44 |
| IV.1. Recherche bibliographique et liste des plantes à vertus insecticides... | 44 |
| IV.2. Choix des plantes | 46 |
| IV.3. Extraction chimique | 48 |
| IV.3.1. Extraction éthanolique (tableau 5) ----- | 48 |



| | |
|---|-----------|
| IV.3.2. Extrait des fractions aqueuses et hexaniques ----- | 48 |
| IV.4. Collecte et élevage des moustiques | 49 |
| IV.5. Test de sensibilité des moustiques..... | 50 |
| IV.5.1. Aux produits de références OMS ----- | 50 |
| IV.5.2. Aux extraits de plantes ----- | 50 |
| IV.6. Travaux sur le terrain à Beforona, Marozevo et Soa | 55 |
| IV.6.1. Capture de nuit sur appât humain ----- | 55 |
| IV.6.2. Moustiques capturés en faune résiduelle et effet des insecticides ----- | 67 |
| V. DISCUSSIONS..... | 75 |
| V.1. Recherche bibliographique et liste des plantes à vertus insecticides.... | 75 |
| V.2. Collecte des plantes..... | 75 |
| V.3. Extraction chimique | 75 |
| V.4. Collecte et élevage des moustiques | 76 |
| V.5. Test de sensibilité des moustiques aux extraits de plantes..... | 77 |
| V.6. Travaux sur le terrain à Beforona, à Marozevo et à Soa..... | 78 |
| V.6.1. Capture de nuit sur appât humain ----- | 79 |
| V.6.2. Moustiques capturés en faune résiduelle ----- | 81 |
| V.7. Impact des insecticides sur les moustiques vecteurs..... | 82 |
| V.7.1. Impact des deux extraits de plantes codées respectivement PKT et RDO II.----- | 83 |
| V.7.2. Insecticide de synthèse recommandé par l'OMS ----- | 83 |
| CONCLUSION | 85 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 87 |
| ANNEXES | I |



INTRODUCTION

Le paludisme est le problème de santé publique le plus grave et reste la première endémie mondiale. En Afrique tropicale, presque la totalité de la population, environ 550 millions de personnes vivent en zone impaludée : près de 75% de la population habitent dans des zones de forte endémie et 18% environ sont sous la menace d'épidémie de paludisme. L'OMS estime qu'il s'y produit chaque année entre 270 et 480 millions de cas cliniques et entre 1,5 et 2,7 millions de décès (<http://asmt.louis.free.fr/epidemio.html>).

A Madagascar, le paludisme est parmi la première cause de morbidité en consultation externe des Centres de Santé de Base (CSB) et au niveau des Centres Hospitaliers de District (CHD). Le Service de la Surveillance Epidémiologique et de la Gestion des Informations Sanitaires compte environ 1,6 millions de cas de fièvre à suspicion de paludisme en 2002 (Annuaire des Statistiques du Secteur Santé de Madagascar).

La découverte en 1939 par Paul Müller des propriétés insecticides du Dichloro-Diphényl-Trichloréthane communément appelé DDT, a constitué une avancée majeure dans la lutte contre les maladies à transmission vectorielle. Ce produit est en effet extrêmement efficace contre les moustiques intradomiciliaires lorsqu'il est pulvérisé sur les murs et les plafonds des habitations. Il est également efficace contre d'autres insectes piqueurs tels que les puces, les poux, les punaises de lit et les triatomes [Rozendaal J. A. et al., 1999 (48)].

Pendant les années 50 et au début des années 60, dans de nombreux pays (y compris Madagascar), des programmes de lutte ont été organisés visant à maîtriser les maladies à transmission vectorielle (paludisme, maladie de Chagas et leishmanioses) par des épandages de DDT à grande échelle, d'après ces mêmes auteurs.

Au début, ces programmes connurent un large succès et dans un certain nombre de pays, on parvint même à interrompre ou du



moins à réduire les activités de lutte antivectorielle. Cependant, dans la plupart des pays, ces succès furent de courte durée et les vecteurs acquériraient souvent une résistance aux insecticides qui contraignait à se tourner vers des produits nouveaux, d'un prix de revient plus élevé (48).

Suite à l'utilisation répétée des composés organochlorés dans l'agriculture et dans la lutte contre les vecteurs de maladies, la résistance des Anophelinae aux composés organochlorés (DDT, diédrine,...) et aux composés organophosphorés (malathion, fenitrothion,...) a été signalée à Madagascar depuis 1955, (Rapport technique OMS, 1970, n°443). En plus de la résistance des moustiques à ces composés, la dégradation des ces insecticides de synthèse est lente et leurs produits de dégradation s'accumulent tout au long de la chaîne alimentaire sous forme de résidus toxiques (Ranaivoson N., 2000).

Pour résoudre ces problèmes, on a recourt à la lutte biologique qui repose sur l'utilisation d'organismes vivants ou de produits qui en dérivent pour détruire les vecteurs et les ravageurs. Il s'agit en particulier de virus, de bactéries, de protozoaires, de champignons, de plantes, de vers parasites ainsi que de poissons prédateurs des larves de moustiques. On s'efforce en général de détruire les larves sans polluer l'environnement. La lutte biologique donne souvent de meilleurs résultats lorsqu'on la pratique parallèlement à l'aménagement de l'environnement.

Les luttes antivectorielles biologiques les plus utilisées et les plus recommandées sont :

- Les prédateurs : poisson entomophage (*Gambusia*, agent plus efficace pour détruire les larves des moustiques) et insectes larvivores ;
- les agents pathogènes et parasites :
 - les champignons (*Coelomomyces*), les bactéries comme *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* dont la



application pose des problèmes à Madagascar à cause de la grande surface occupée par les gîtes larvaires aquatiques (Ravoahangimalala, 1995) ;

- les insecticides d'origine végétale

Cette dernière est intéressante car ce sont des produits naturels, et en principe non polluants, ne présentant aucun danger pour l'environnement et aucun phénomène de résistance. D'où son choix au cours de ce présent mémoire.

Dans le cadre du sous-projet du Fond d'Appui au Développement de l'enseignement Supérieur (F@des) SPO2v2_05 intitulé: « Renforcement de la Capacité de Recherche pour la Promotion des Insecticides Biologiques », les objectifs sont les suivants:

- objectif principal:
 - rechercher des insecticides d'origine végétale entomopathogène sur les vecteurs du paludisme.
- objectif spécifique :
 - étudier la variation des effectifs des anophèles vecteurs sous l'action des plantes insecticides.

Pour atteindre ces objectifs, les activités ci-après ont été menées :

- étude générale des moustiques ainsi que les plasmodies,
- recherche bibliographique sur les plantes insecticides,
- choix et collecte des plantes dans différentes régions de Madagascar,
- extraction chimique de chaque plante collectée,
- collecte et élevage des moustiques (*An.arabiensis*),
- test de sensibilité des moustiques aux extraits de plante au laboratoire,
- suivi de la population culicidienne dans la Commune Rurale de Beforona avant et après épandage des extraits de plante.



I. GENERALITES

I.1.Parasite : genre *Plasmodium*

Le paludisme est une maladie parasitaire provoquée par des Protozoaires du genre *Plasmodium* qui est représenté chez l'homme par quatre espèces: *Plasmodium falciparum* (espèce prédominante et responsable de 90% de la mortalité due au paludisme), *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*.

La maladie est transmise à l'homme par la piqure des moustiques suivants : *Anopheles gambiae s.l.* (composé par *An. gambiae s.s.* et *An. Arabiensis*), *An. funestus* (Chauvet et al., 1969 - Fontenille, 1990 - Ralisoa 1987) et *An. mascarensis* qui a été trouvé porteur de sporozoïtes par Fontenille à Sainte Marie-Madagascar en 1989. Ce sont les principaux vecteurs de plasmodie à Madagascar en particulier *P. falciparum*.

Le moustique femelle en piquant l'homme parasité absorbe des formes sexuées du parasite ou gamétocytes. Ces parasites poursuivent leur cycle dans le moustique et deviennent des sporozoïtes, formes infestantes du parasite, qui sont stockés dans les glandes salivaires et sont injectés à un homme sain lors d'une piqure.



I.2. Systématique (Dupouy et Camet, 1995)

| | |
|----------------|--|
| Règne: | ANIMAL |
| Embranchement: | PROTOZOA |
| Phylum: | SPOROZOA |
| Classe: | COCCIDIA |
| Sous-classe: | HEMATOZOA |
| Ordre: | HAEMOSPORIDA |
| Famille: | PLASMODIIDAE |
| Genre: | <i>Plasmodium</i> |
| Espèces: | <i>falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>malariae</i> , <i>ovale</i> . |

I.3. Cycle de développement (Baudon, 2001) (Figure 1)

I.3.1. Cycle asexué chez l'homme

Le parasite *Plasmodium* évolue sous différentes formes dans l'organisme de l'anophèle où s'effectue la reproduction sexuée, suivie d'une migration des sporozoïtes dans les glandes salivaires, ensuite transmis via la salive du moustique à l'hôte définitif (homme). Chez l'homme, deux phases se succèdent suivant les conditions du milieu des plasmodies :

▪ Phase exoérythrocytaire

La phase exoérythrocytaire ou phase tissulaire durant laquelle les *sporozoïtes* libérés après la piqûre d'un anophèle infesté, vont migrer vers le foie où ils vont se multiplier et se transforment en *trophozoïtes*, puis en *schizontes intra-hépatiques* et finalement en mérozoïtes. Il est à noter que certains mérozoïtes n'évoluent pas mais restent quiescents pendant un temps plus ou moins variable. Cette phase va aussi permettre au parasite de survivre longtemps dans l'organisme, alors qu'il aura disparu du sang. C'est ce qui explique les



rechutes à longue échéance pour les deux espèces de *Plasmodium* : *vivax* et *malariae*.

▪ Phase endoérythrocytaire

La phase endoérythrocytaire ou cycle de Golgi pendant laquelle les *mérozoïtes* libérés dans le foie vont passer dans les hématies, y pénètrent pour devenir de nouveaux *mérozoïtes*. L'éclatement de ces hématies est le responsable des frissons lors de la manifestation clinique du paludisme. Les *mérozoïtes* libérés vont parasiter d'autres globules rouges et le cycle asexué continue.

Après quelques cycles asexués apparaissent des parasites de forme spéciale, les gamétocytes qui restent dans le sang périphérique. Ce sont des formes sexuées produites par le *Plasmodium*.

Les parasites lors de cette phase n'ont aucune chance de survie dans l'homme. Ils restent vivants jusqu'à 20 jours puis disparaissent. Ils ne pourront poursuivre leur évolution que chez le moustique.

I.3.2. Cycle sexué chez le moustique femelle

En prenant son repas sanguin sur un paludéen, l'anophèle femelle peut absorber des trophozoïtes, des schizontes, des *mérozoïtes* et des gamétocytes mais seuls ces derniers assurent la poursuite du cycle.

Dans le mésentéron, le gamétocyte mâle, après division, subit une exflagellation pour donner des microgamètes mâles tandis que le gamétocyte femelle, par accumulation des réserves et par expulsion de corpuscules chromatiniennes, se transforme en macrogamète femelle ou ovule.

La fécondation du gamète femelle par le gamète mâle a lieu dans le mésentéron de l'insecte. Elle va donner un œuf mobile appelé ookinète. C'est la phase de reproduction sexuée du parasite.

L'ookinète traverse la paroi de le mésentéron de l'insecte et forme un oocyste qui se divise en plusieurs centaines de



cellules. L'oocyte (une forme enkystée de l'œuf dont le noyau va se diviser) éclate et libère des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l'anophèle.

Lorsque le moustique pique une personne pour prendre un repas de sang, les sporozoïtes sont injectés chez cette personne avec la salive. Et le cycle continue...

Selon les espèces de plasmodies et la température, 7 à 30 jours sont nécessaires entre l'ingestion par la femelle anophèle de sang humain infecté et l'apparition de nouveaux parasites dans ces glandes salivaires (tableau 1)

Tableau 1 : Durée d'incubation extrinsèque suivant les espèces plasmodiales et la température (d'après Rhodain et Perez, 1985)

| Température | <i>P. falciparum</i> | <i>P. vivax</i> | <i>P. malariae</i> | <i>P. ovale</i> |
|-------------|----------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| 15° | | Stoppé | | |
| 16° | | | Stoppé | Stoppé |
| 18° | stoppé | | | |
| 24° | 18 jours | 14 jours | 30 jours | |
| 25° | 13 jours | 10 jours | 21 jours | |
| 26° | | | | 15 jours |
| 28° | | 8 jours | | |
| 30° | 9 jours | 7 jours | 15 jours | |
| 35° | Stoppé | Stoppé | stoppé | stoppé |

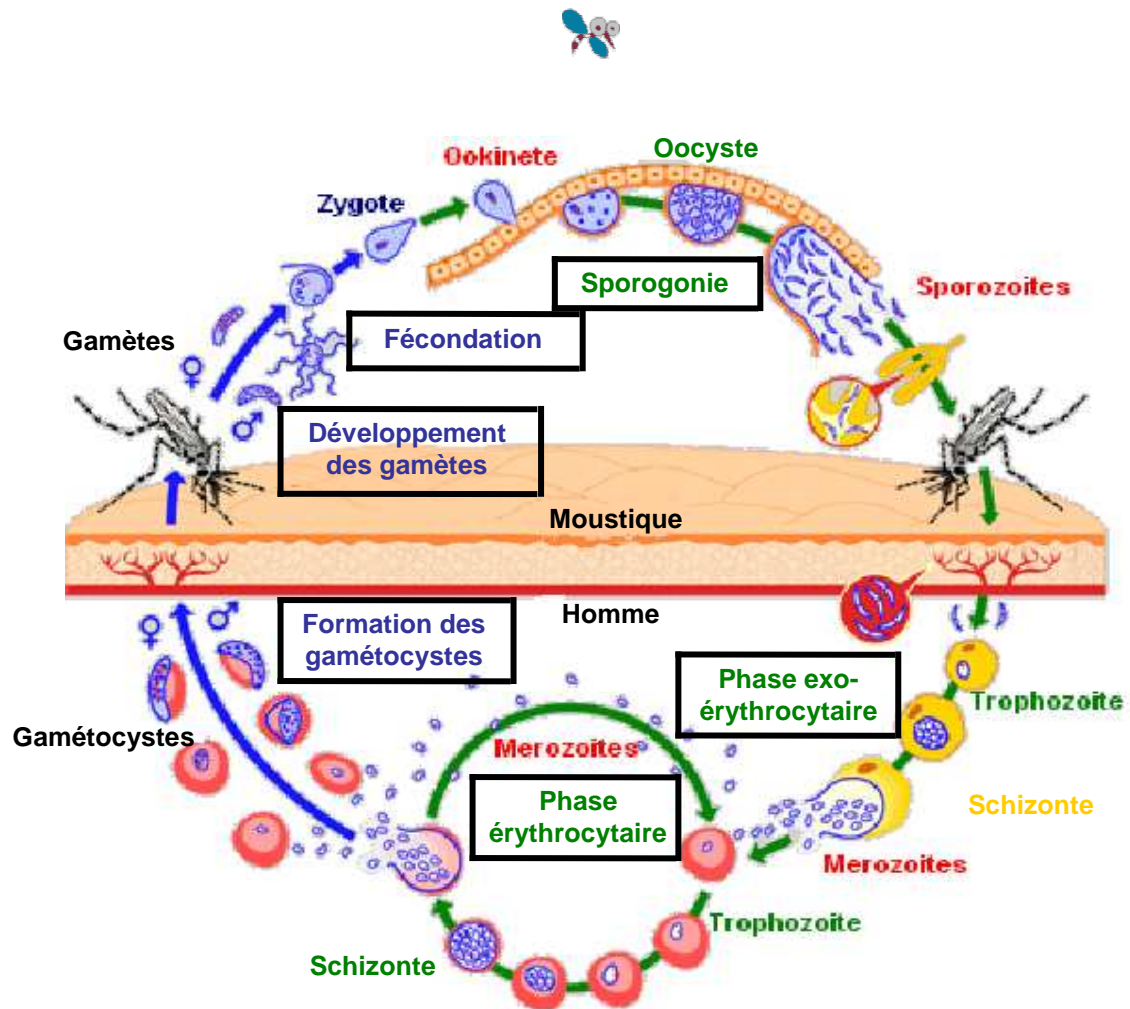


Figure 1 : Cycle biologique de *Plasmodium* (Source: Logiciel Nature, Ed. 2003 modifié par Fano Randrianambinintsoa)

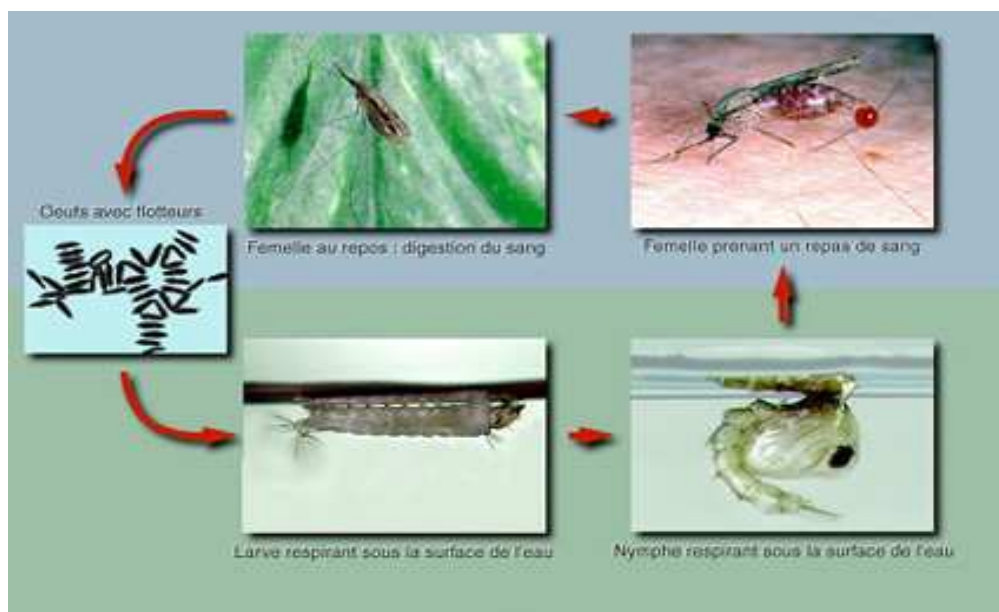


Figure 2 : Cycle d'un moustique genre *Anopheles* (Source: Brunhes et al., Les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM Ed., 1998)



I.4.Moustique : genre *Anopheles*

I.4.1. Systématique (Chauvet *et al.*, 1969)

| | |
|------------------|---|
| Règne : | ANIMAL |
| Embranchement : | ARTHROPODES |
| Classe : | INSECTES |
| Ordre : | DIPTERES |
| Sous-ordre : | NEMATOCERES |
| Famille : | CULICIDES |
| Sous - famille : | ANOPHELINES |
| Genre : | <i>Anopheles</i> |
| Sous genre : | <i>Cellia</i> |
| Espèces : | <i>gambiae s.s.</i> (Giles, 1902) <i>funestus</i> (Giles, 1900) <i>arabiensis</i> (Patton, 1905) <i>mascarensis</i> (De Meillon, 1947) |

I.4.2. Cycle de développement (Robert, 2001) (Figure 2)

Les femelles de certaines espèces d'anophèles, chez lesquelles s'effectue le cycle sexué des plasmodies, assurent la transmission du paludisme d'homme à homme par leur piqure.

Comme tous les Diptères, les moustiques sont holométaboles, c'est-à-dire qu'ils présentent des métamorphoses complètes et passent au cours de leur vie par 4 stades larvaires, un stade nymphal en milieu aquatique et un stade imaginal en milieu terrestre.

A l'émergence, les moustiques mâles et femelles se nourrissent de nectar ou jus sucré. L'accouplement est unique pour un moustique femelle et elle doit prendre un repas de sang pour la maturation de ses œufs (Ambroise *et al.*, 1991).

La ponte a lieu 3 jours après le repas de sang (100 à 200 œufs par ponte). Après la ponte, quand la température est élevée, la femelle se met en quête d'un nouvel hôte et un nouveau cycle recommence. 8 cycles successifs peuvent être observés, quelque fois davantage. La durée de vie d'un



moustique est d'environ un mois (variable selon les conditions, notamment climatiques).

Les moustiques mâles ne piquent jamais et ne transmettent aucune maladie.

I.4.3. Stade pré-imaginal

De chaque oeuf éclos une seule larve d'environ 1 mm. Cette larve est aquatique et se nourrit en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. Il y a quatre stades larvaires séparés par trois mues larvaires. La larve de stade 4 mesure 5 mm à 1 cm.

7 à 21 jours (selon la température) s'écoulent entre l'œuf et l'émergence de l'insecte adulte.

La larve de quatrième stade effectue une mue particulière, la nymphose. Cette dernière libère une nymphe aquatique mobile qui ne se nourrit pas. Des profonds remaniements morphologiques et anatomiques s'effectuent au cours du stade nymphal. Les organes propres au stade larvaire (appareil buccal filtreur-broyeur, système digestif détritophage-filtreur) sont détruits ; les organes caractéristiques de l'adulte qui étaient présents à l'état d'ébauches dans la larve (ailes, pattes, appareil buccal piqueur-suceur, système digestif d'hématophage) apparaissent.

I.4.4. Stade imaginal

Après la métamorphose, de la nymphe émerge un adulte, mâle ou femelle qui s'envole rapidement. C'est au cours de la phase aérienne, le plus souvent dans un essaim de mâles réunis au crépuscule, que s'effectue l'insémination de la femelle néonate. Les spermatozoïdes sont introduits dans la bourse copulatrice de la femelle, puis ils migrent dans une spermathèque, sorte d'annexe du système sexuel femelle, dans laquelle ils conservent leur pouvoir fécondant pendant plusieurs semaines, jusqu'à la mort de la femelle.

Mâles et femelles se nourrissent de jus sucrés, nectars et autres exsudats végétaux. Le mâle est incapable de perforer la



peau d'un vertébré. Seule la femelle est hématophage : un repas sanguin n'est pas indispensable à sa survie, mais il l'est à la maturation ovarienne, comprenant habituellement 150 oeufs chez *An. gambiae*.

I.4.5. Notion de gîte larvaire

Le gîte larvaire est le milieu où se développent tous les stades aquatiques du moustique. Chaque espèce d'anophèles a ses préférences pour le lieu de ponte.

Dans la nature, il y a les gîtes permanents (puits, mares, collections d'eau stagnante, ruisseaux et rivières) et les gîtes temporaires (soit d'origine pluviale, soit des trous alimentés par la nappe phréatique et les rizières).



II. PRESENTATION DE LA LOCALITE D'ETUDE

Madagascar appartient à la zone Afro-tropicale (Rhodain et Perez, 1985). Le climat et le relief tiennent un rôle important dans la transmission du paludisme dans la grande île. Ils déterminent les grands faciès épidémiologiques suivants (Mouchet *et al.*, 1993) (Annexe I) :

- le faciès équatorial : cette strate correspond aux domaines de l'Est et du Sambirano. La transmission anophélienne est intense et permanente.
- le faciès tropical : il recouvre le Versant Ouest et les marges des Hautes terres, le Moyen Ouest, le Nord et la Côte Ouest. La transmission est à recrudescence saisonnière longue (supérieure à 6 mois) entraînant un paludisme stable.
- les Hautes Terres Centrales : cette région correspond à toute la province d'Antananarivo (domaine de l'Imerina) et la partie occidentale de la province de Fianarantsoa (domaine du Betsileo). La transmission est à recrudescence saisonnière courte.
- le faciès Sud : ce faciès recouvre 13 % du territoire, région de l'Androy comprise. Le paludisme est caractérisé par une transmission saisonnière et instable. Cela est lié aux pluies irrégulières et ponctuelles.

Notre étude s'est déroulée dans la partie Centrale Est de Madagascar.

La zone d'étude se trouve dans la Province autonome de Toamasina, dans la circonscription de Moramanga à plus de 100Km d'Antananarivo et dans la région Alaotra-Mangoro.

Cette zone a été choisie pour l'étude de suivi sur terrain de la dynamique de la faune culicidienne avant et après l'épandage des insecticides à cause de la présence des trois vecteurs du paludisme (*An. gambiae* s.l. composés par *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* et *An. funestus*).



II.1. Climat (Donque, 1975)

Le climat de Madagascar est essentiellement de type tropical et on distingue deux types de saison:

- saison fraîche et sèche de mai à octobre;
- saison chaude et pluvieuse de novembre à avril

La zone d'étude se trouve dans le Fivondronana de Moramanga et fait partie du domaine de l'Est ou le domaine au vent, caractérisé par le vent d'alizé, apportant ainsi de l'humidité qui se déverse tout au long de la côte Est jusqu'à un certain niveau d'altitude. Les précipitations sont abondantes et une véritable saison sèche n'existe pas. Cette région est alors soumise à un climat du versant oriental qui n'est pas très loin du climat de la plaine côtière orientale. Les précipitations annuelles dépassent par endroits à plus de 300 mm et le nombre de jours de pluies annuelles est de 162 jours en 2000 dans la Station Météorologique de Moramanga. La température moyenne est de 19,62°C.

Tableau 2 : Données climatiques (température et pluviométrie) de Moramanga en 2000

| Mois | Température (°C) | Précipitation (mm) |
|-----------|------------------|--------------------|
| Janvier | 23,45 | 139,7 |
| Février | 20,65 | 386,2 |
| Mars | 20,00 | 246,5 |
| Avril | 19,80 | 12,2 |
| Mai | 16,55 | 24,1 |
| Juin | 15,35 | 59,3 |
| Juillet | 14,60 | 38,7 |
| Août | 18,90 | 4,9 |
| Septembre | 19,40 | 23,5 |
| Octobre | 19,95 | 8,1 |
| Novembre | 22,80 | 72,6 |
| Décembre | 23,95 | 184,8 |

(Source : Direction Générale de la Météorologie Ampandrianomby Antananarivo)



Les précipitations moyennes mensuelles varient de 4,9 mm à 386,2 mm. En général, la moyenne annuelle des températures est de 19,62°C (tableau 2).

II.2. Zone d'étude (Beforona, Marozevo et Soa)

II.2.1. Topographie (figure 3 et 4)

Les sites d'étude sont Beforona et Marozevo situés à respectivement à 159km et Marozevo à 166km d'Antananarivo. Le dernier site Soa se trouve à quelques kilomètres de Marozevo. Avant l'épandage, Beforona et Marozevo sont considérés comme de sites de suivi de la biologie de la faune culicidienne.

II.2.2. Végétation (Grejbine, 1966)

Du point de vue botanique, les formations naturelles en majeure partie constituée par la forêt humide de l'Est, ont largement disparu, suite à la destruction par abattage et la pratique du « tavy » pour faire place à des cultures vivrières (riz, manioc, gingembre, légumes,...).

Cette destruction a abouti à l'apparition d'un type de végétation appelée « savoka » qui est une végétation d'abord avec des Graminées (*Hypparhénia*, *Panicum*,...) puis enrichie en bambous ou Ravenala (savoka à bambous ou Ravenala).

Cette savoka elle-même est abattue et brûlée pour disparaître à son tour et laisser la place à une végétation dégradée à base de Graminées. Le sol est rendu stérile par la destruction de l'humus : une érosion rapide se déclenche et la latérite affleure.

II.2.3. Peuplement et ressources

La population est composée d'un brassage d'ethnies dont la majorité est constituée par les Bezanozano auxquels s'ajoutent les Sihanaka, les Betsimisaraka et les Merina.



II.2.3.1. Site 1 : Beforona (site témoin) (18°41'30.4" S / 49°01'20.2" E / 530 m)

La commune de Beforona se trouve dans le Fivondronana de Moramanga et dans la Province autonome de Toamasina sur la route nationale n°2 (figure 3).

Ce Fokontany est traversé par la rivière Ranovolo qui se jette dans la grande rivière d'Ilazana.

Le village de Beforona regroupe 1368 habitants (d'après le registre de la Commune Rurale de Beforona, recensement 2000).

La majorité des habitations sont construites en bambou, avec une toiture en chaume et quelques unes construites en bois ou en dur avec des toitures en "falafa" (feuille de Ravenala) ou en tôle.

Porcs et volailles constituent les principaux animaux d'élevage. Les porcheries et poulaillers sont installés tout près des habitations.

La majorité des populations de Beforona sont des cultivateurs, des commerçants et quelques fonctionnaires (personnels du CSB II et de la commune, instituteurs et agents de l'armée).

Au village de Beforona, dans 3/10 des maisons, les habitants utilisent des voiles moustiquaires imprégnées de pyréthroïdes. Les occupants de 2/10 des maisons emploient des voiles moustiquaires simples. L'utilisation des spirales à brûler (antimoustiques) est constatée dans 2/10 des maisons et les restes c'est à dire les habitants des 3/10 des maisons n'utilisent aucune protection contre les moustiques.

II.2.3.2. Site 2 : Marozevo (site traité par PKT): (18°58'26.9" S / 48°36'56.6" E / 445 m)

Le village de Marozevo se trouve dans la commune de Beforona, Fivondronana Moramanga/Province autonome de Toamasina, sur la route nationale n°2 (figure 4).

Ce Fokontany est traversé par la grande rivière Ilazana.

Le village de Marozevo regroupe 375 habitants (d'après le



registre de la commune de Beforona, recensement 2000).

Le village est composé de quelques hameaux situés le long et au bord de la route nationale n°2. La plupart des maisons sont construites en bambous avec des toitures en chaumes. Rares sont celles construites en dur avec des toitures en tôle.

Quelques habitants sont des commerçants. Mais, la majorité de la population sont des agriculteurs. L'élevage de porc et volaille est fréquent. Le riz, le gingembre et la banane sont les plus cultivés.

Dans le village de Marozevo : dans une maison sur 10, les habitants utilisent des voiles moustiquaires imprégnés de pyréthroïdes, les occupants de 5/10 emploient des moustiquaires simples, les restes c'est-à-dire des habitants de 4/10 des maisons n'utilisent aucune protection contre les moustiques.

II.2.3.3. Site 3 : Soa (site traité par RDO II) (18°58'45.8" S / 48°37'13.6" E / 439 m)

Soa est un village qui se trouve à quelques kilomètres du Fokontany de Marozevo. L'altitude de ce village est de l'ordre 439 m. Il fait partie de la commune rurale de Beforona (figure 4)

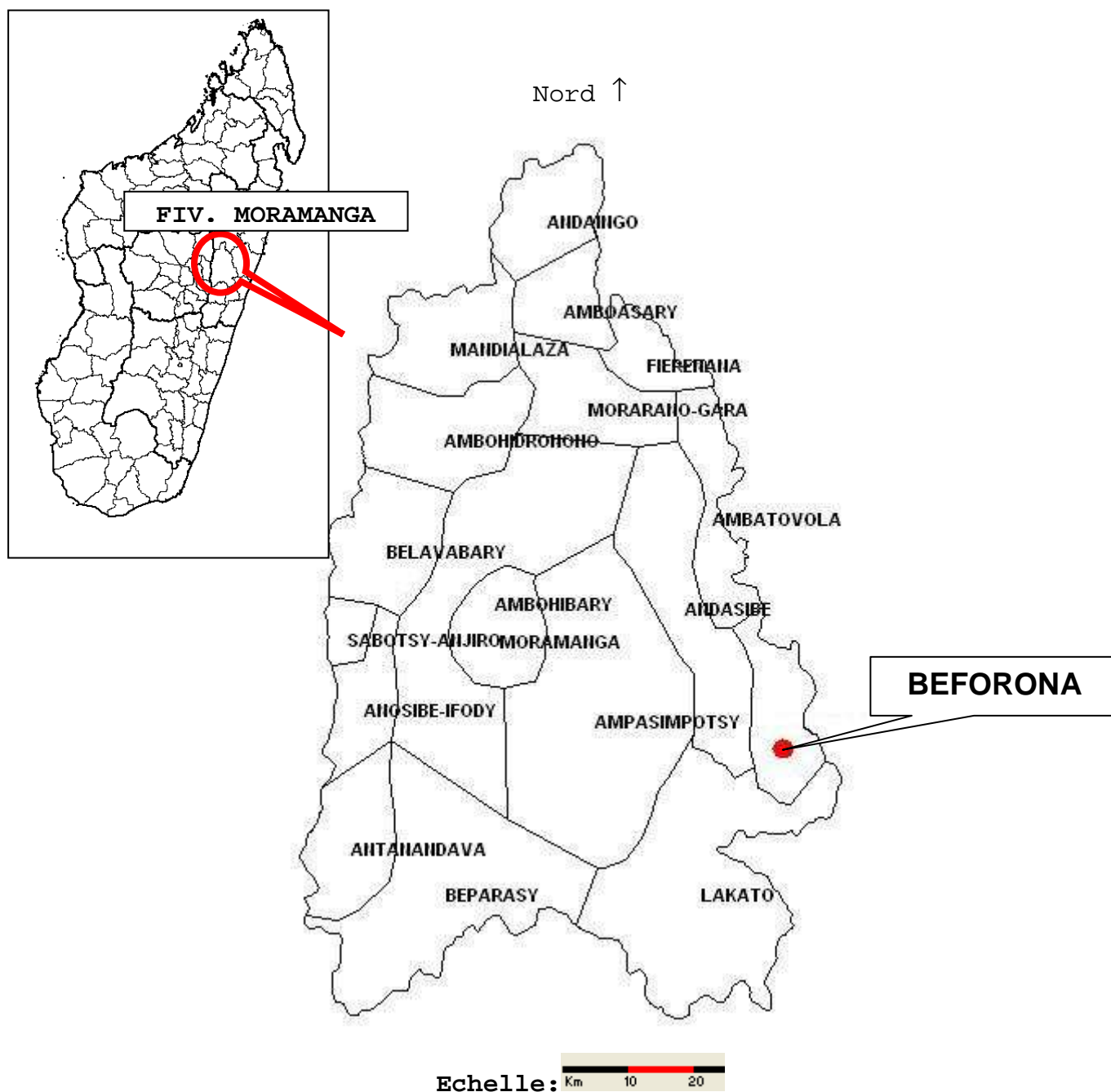
Le village est construit dans une vallée au bord de la route nationale n°2. 99% de la population sont des agriculteurs. Des Organisations Non Gouvernementales (ONG) d'envergure internationale (Exemple: **LDI, ADRA,...**) sont implantées dans ce village pour aider la population à améliorer de leur méthode de culture. La culture vivrière (riz, manioc, légumes,...) est la préoccupation des habitants.

Soa est habité par une centaine d'habitants répartis dans des maisons en bambou aplati. En général, les toits des maisons sont en matières végétales sauf dans des rares cas où ils sont en tôles.

L'Ecole Primaire Publique (EPP) de Marozevo est la seule école proche pour les enfants de ces villages. Ces enfants

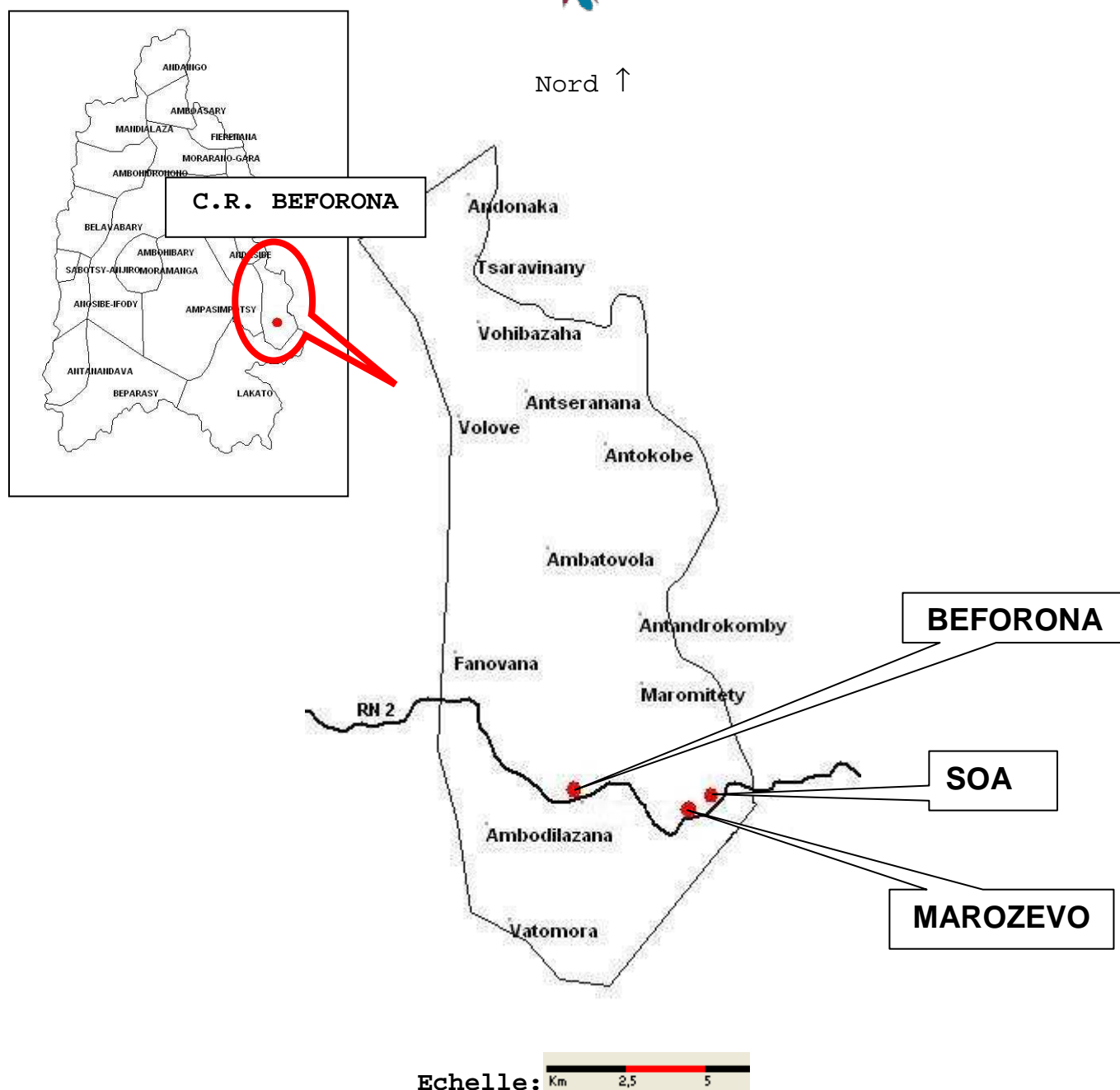


doivent faire plusieurs kilomètres à pieds pour atteindre cette école.



(Source HealthMapper 2002 modifié par Fano Randrianambinintsoa)

Figure 3 : Fivondronana de Moramanga incluant la Commune Rurale de Beforona sur la partie Est de la carte (en point rouge)



(Source HealthMapper 2002 modifié par Fano Randrianambinintsoa)

Figure 4 : Commune Rurale de Beforona avec les trois sites d'études Beforona, Marozevo et Soa qui sont montrés par les points rouges.



III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Recherche bibliographique et liste des plantes à vertus insecticides

Les plantes ont été choisies d'après des recherches bibliographiques dans des centres de documentations et par Internet. Une liste montrant les plantes qui ont des capacités insecticides a été dressée à partir de cette étude.

III.2. Collecte des plantes

La collecte des plantes a été effectuée :

- dans la zone suburbaine d'Antananarivo,
- à la périphérie de la Commune Rurale d'Andriampamaky (Fivondronana de Manjakandriana),
- au Sud des Hautes Terres Centrales aux environs de la Commune Rurale d'Ambatofinandrahana (Fivondronana d'Ambatofinandrahana)
- et au Sud-Est de Madagascar aux alentours de la Commune Urbaine de Manakara (Fivondronana de Manakara).

Des enquêtes ethnobotaniques ont été faites auprès des habitants, le maximum d'information a été collecté sur chaque plante et une quantité importante de plantes a été récoltée pour l'extraction et pour l'herbier.

Les plantes ont été récoltées à l'aide d'un sécateur, puis un ou deux échantillons (fleurs et/ou tige(s) et/ou feuilles et/ou fruits) sont placés entre deux feuilles de journal pour l'herbarium et les restes conservées dans des sacs de jutes afin de les transporter au laboratoire pour le séchage et l'extraction.

III.3. Extraction chimique

L'extraction chimique a été faite dans le laboratoire du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques (CNARP). Plusieurs méthodes d'extraction ont été utilisées pour avoir les meilleurs rendements possibles. Avant de



procéder à l'extraction chimique proprement dite, les plantes collectées sont séchées dans le séchoir du centre puis broyées et pesées. Les broyats ainsi obtenus sont prêts pour tous types d'extraction selon les résultats qu'on veut obtenir.

III.3.1. Matériels

Ampoule à décanter: permet de séparer deux liquide non miscibles.

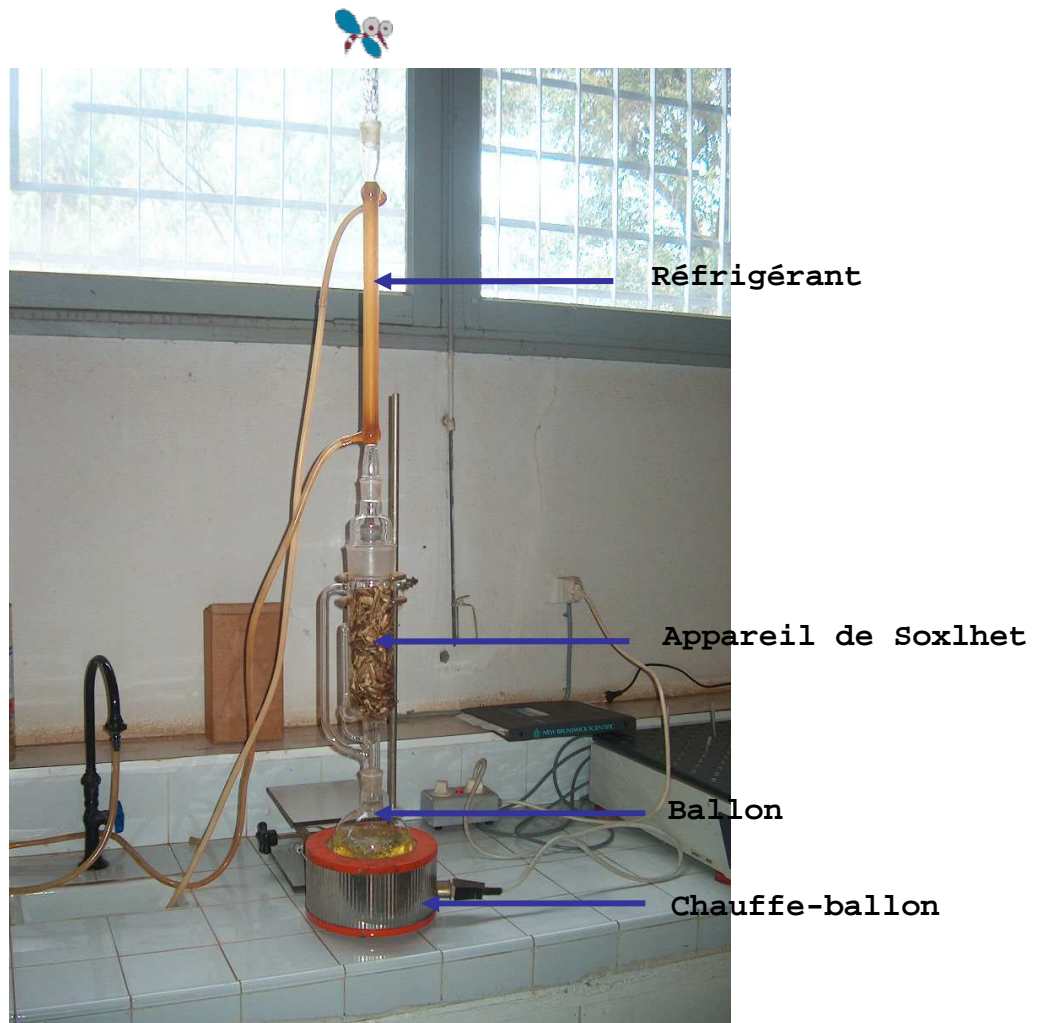
Appareil de Soxhlet (Figure 5): est constitué de trois parties:

- une réserve de solvant et quelques grains de carborundum contenus dans un ballon chauffé par une chauffe-ballon;
- un appareil en verre permettant le contact entre le solvant et le solide à extraire dans une cartouche poreuse et l'évacuation de la solution ainsi formée vers le ballon réserve par l'intermédiaire d'un siphon ;
- un réfrigérant à eau permettant la condensation des vapeurs de solvant dans la cartouche poreuse qui contient le solide à extraire.

Ainsi, l'appareil de Soxhlet permet le remplissage régulier de la cartouche par un solvant pur, celui-ci étant continuellement distillé dans le ballon. Le solide à extraire est toujours en contact avec le solvant pur, ce qui assure une extraction continue et efficace.

Au cours de l'opération, le ballon recueille la fraction du solide à extraire la plus soluble dans le solvant utilisé.

Rotavapor: l'extrait et le solvant y sont évaporés des solvants sous vide à 50°C, cette température permet de ne pas dénaturer les substances naturelles sensibles à la température.



(Photo : Fano Randrianambinintsoa, © 2004)

Figure 5 : Appareil de Soxhlet et ses accessoires (réfrigérant, ballon et chauffe-ballon). Ici, l'appareil est rempli de broyat de plante

III.3.2. Méthodes

Trois types d'extraction ont été effectués : extraction alcoolique, extraction liquide-liquide et extraction de Soxhlet.

III.3.2.1. Extraction alcoolique

Avant de commencer l'extraction, le broyat de plantes est macéré dans de l'éthanol pendant au moins 24 heures. Après la macération s'effectue la filtration. Le filtrat est évaporé sous-vide à l'aide d'un rotavapor jusqu'à l'élimination complète de l'éthanol. L'extrait éthanolique ainsi obtenu est conservé à basse température (-25°C) dans une boîte bien fermée.



III.3.2.2. Extraction liquide-liquide

L'extraction repose sur l'utilisation du différentiel de solubilité d'un composé donné dans deux solvants non miscibles

Les différents constituants de l'extrait éthanolique sont séparés selon leur solubilité dans les deux phases liquides non miscibles.

La fraction éthanolique resolubilisée dans l'eau est extraite par des solvants de polarité croissante : hexane et chloroforme.

L'extrait éthanolique sec a été repris par de l'eau et de l'hexane, deux solvants non miscibles et dans la proportion 1/1 (500ml/500ml). La solution obtenue est transvasée dans une ampoule à décanter. Ce mélange est agité manuellement pendant quelques minutes. La phase hexanique et la phase aqueuse sont séparées après décantation. La phase aqueuse est reprise avec 500ml de chloroforme. Ce mélange est de nouveau transvasé puis agité et laissé quelques minutes voire quelques heures pour être décanté.

Chaque étape de séparation est répétée au moins trois fois afin d'obtenir un rendement élevé jusqu'à l'épuisement des substances solubles respectivement dans les solvants organiques utilisés successivement.

Les phases hexanique et chloroformique sont concentrées par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor. La phase aqueuse est lyophilisée.

Le rendement est calculé par le rapport du poids de l'extrait sec obtenu et le poids du broyat végétal sec.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Poids de l'extrait obtenus}}{\text{Poids du broyat végétal sec}} \times 100$$

III.3.2.3. Extraction de Soxhlet

L'extraction se fait dans l'appareil de Soxhlet (figure 7). Le solvant utilisé est de l'hexane puis du chloroforme (1



litre). Le poids du broyat est de 300 grammes à chaque manipulation.

III.4. Collecte et élevage des moustiques

L'élevage a été initié à l'insectarium de l'Institut Pasteur de Madagascar puis continué à l'insectarium du Laboratoire de Biologie des Populations Parasitaires (LBPP) au sein du Département de Biologie Animale.

Le stade et le cycle de développement du moustique de l'œuf jusqu'au stade imaginal ont été suivis et les moustiques obtenus sont utilisés pour tester la sensibilité des moustiques aux extraits de plantes.

III.4.1. Matériels de climatisation

Un ruban chauffant (2300 watts) et un régulateur d'énergie en marche de manière permanente assurent le maintien de la température de l'insectarium pour le bon développement des larves et des imagos de moustiques. Les larves de moustiques sont élevées dans de l'eau déchlorée. Cette dernière est aussi utile pour maintenir constante l'humidité à l'intérieur de l'insectarium.

Un thermohygrographe est installé à l'intérieur de l'insectarium pour suivre la variation de la température au cours de l'élevage.

III.4.2. Méthodes

L'élevage s'effectue dans un insectarium où la température est maintenue à $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, l'humidité 70-80% et la photopériode de 12 heures de nuit et 12 heures de jour.

La souche de femelle d'*An. arabiensis* maintenue en élevage a été collectée à l'aide d'un aspirateur à bouche dans les parcs à bœuf d'un éleveur dans un petit village près de la commune rurale d'Alasora.

Les moustiques collectés sont des femelles gorgées.



III.4.2.1. Elevage et alimentation

Après quelques heures de repos les moustiques collectés commencent à pondre. Un pondoir contenant une petite quantité d'eau bouillie et refroidie est placé dans chaque cage. Après une ou plusieurs pontes, le pondoir est retiré et les œufs sont transférés dans un récipient adapté pour l'élevage.

Après l'éclosion, les larves sont nourries avec de la poudre de biscuit pour chien, « Feed Mill® » et « Tetra Baby Fish Food® » (à titre ponctuelle) diluée dans une faible quantité d'eau. La quantité mise dans chaque bac d'élevage est variable suivant le nombre de larves et leur stade respectif.

Après la mue imaginale, les adultes d'*An. arabiensis* sont disposés dans des cages cubiques (de 30 cm de côté) recouvertes de tulle moustiquaire : l'une des faces comporte une ouverture pourvue de manchon par lequel on peut effectuer diverses manipulations. Les imagos sont nourris avec une solution sucrée, le sang nécessaire pour gorger les femelles adultes provient de l'homme ou de souris anesthésiée.

III.4.2.2. Estimation de la durée des différents stades

- Les larves de stades I sont retirées dès le jour de l'éclosion et elles sont réparties par lots de 100 individus dans les bacs d'élevage.
- Les autres stades larvaires sont triés et réparties par stades larvaires dans des bacs différents. Le nombre par stades larvaires est noté et les larves mortes retirées. La durée des différents stades préimaginaux est calculée par le suivi du développement des différents stades jusqu'à la mue. Au cours de la journée, l'apparition des nymphes est enregistrée par comptage.
- Les nymphes sont distribuées dans des cristallisoirs disposés dans des cages à émergence, l'apparition des imagos est enregistrée par comptages horaires.
- Après l'émergence, les femelles doivent se reposer de 12 à 24 heures et les mâles pendant trois jours pour que leur



exosquelette durcisse et que les organes reproducteurs puissent acquérir leur maturité.

- Les mâles et fréquemment les femelles, prennent un repas de jus sucré, pour satisfaire leur besoin énergétique.
- Après le 3^{ème} jour de leur vie imaginale, les mâles s'accouplent avec les femelles âgées de un à deux jours.
- Deux ou trois fois par semaine, les femelles hématophages se gorgent de sang sur des souris anesthésiées qui sont posées sur chaque cage pendant toute une nuit. L'ovaire de la femelle comporte des ovocytes peu développés ; leur accroissement jusqu'au terme de l'ovogenèse exige des protéines que l'anophèle trouve dans le sang de Vertébrés.
- Les femelles sont retirées après gorgement et transférées définitivement dans une cage avec pondoir.

Après chaque cycle d'élevage, la tulle des cages et les bacs d'élevage sont systématiquement lavés et désinfectés ; les pondoirs et les récipients alimentaires sont stérilisés si nécessaires pour éviter la formation des champignons.

III.4.2.3. Rendement

Le rendement est calculé par le rapport du nombre total d'adultes (♂ et ♀) obtenus sur le nombre total d'œufs pondus.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Nombre total d'adultes obtenus}}{\text{Nombre total d'œufs pondus}} \times 100$$

III.5. Test de sensibilité des moustiques aux extraits de plantes

Le test de sensibilité des moustiques aux extraits de plantes a été fait au Laboratoire de Biologie des Populations Parasitaires (Département de Biologie Animale Faculté des Sciences Antananarivo).

III.5.1. Matériels (figure 7)

- des tubes en matière plastique de 125 mm de longueur et de 44 mm de diamètre : les uns marqués d'une pastille rouge



serviront à exposer les moustiques à l'insecticide (tube à extrait) ; les autres marqués d'une pastille verte seront utilisés pour observer les témoins non exposés à l'insecticide (tube témoin) ;

- des manchons filetés aux deux extrémités traversés perpendiculairement à leur axe d'une plaque coulissante percée d'un orifice de 20 mm de diamètre ;

- des feuilles de papier Joseph (12 cm x 15 cm) neutres et imprégnées par des extraits de plante à concentration croissante ;

- des bagues métalliques destinées à maintenir les papiers contre les parois des tubes ;

- des tubes d'aspiration en verre ou plastique, de 12 mm de diamètre et un tube souple de 60 cm de longueur.

III.5.2. Méthode

III.5.2.1. Test de sensibilité des adultes de moustiques (OMS, 1975 et 2003) (figure 6 et 7)

Des lots d'insectes adultes de 20 moustiques sont introduits dans chaque tube d'exposition à l'aide d'un aspirateur à bouche. Chaque tube de transfert est préalablement tapissé de papier neutre ne portant pas de produit. Une période d'attente et de suivi préliminaire d'une heure est imposée pour pouvoir éliminer les insectes traumatisés ou faibles.

Après cette heure d'observation, le papier neutre est remplacé par un papier portant la dose d'insecticide à tester. Les papiers pour les tests doivent être imprégnés de concentration croissante d'extrait à tester. Le contact avec le produit dure 24 heures.

III.5.2.2. Calcul des concentrations létales

Concentration Létale 50 (CL₅₀) et Concentration Létale 90 (CL₉₀): concentrations de chaque extrait, qui, dans un test de toxicité biologique, sont respectivement responsables de la



mortalité de 50% et 90% des moustiques mis en contact pendant 24 heures.

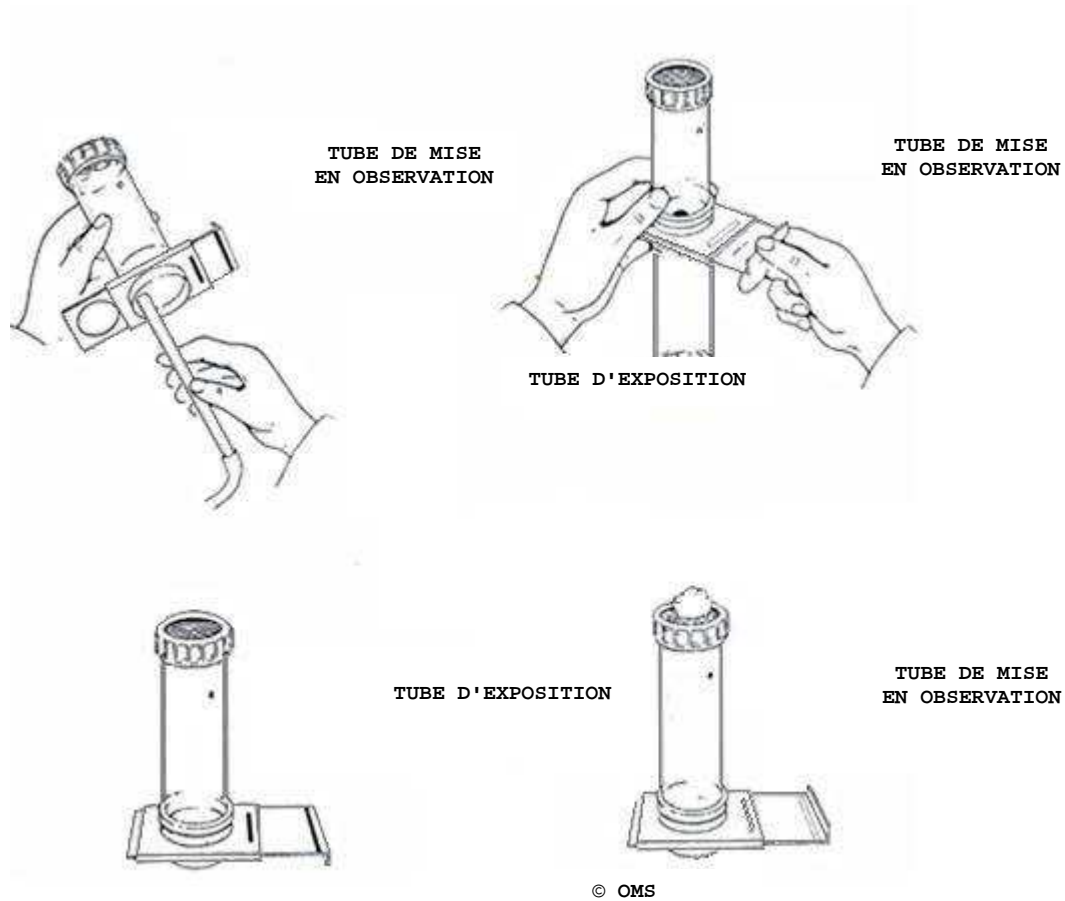


Figure 6 : Test de sensibilité des moustiques (Manuel d'entomologie, OMS 2003)



(Photo : Fano Randrianambinintsoa, © 2004)

Figure 7 : Test de sensibilité au LBPP : (de gauche à droite) tube n°1=témoin; n°2=0,5 mg/cm², n°3=1 mg/cm² et n°4=2,5 mg/cm²



III.6. Travaux sur le terrain à Beforona, Marozevo et Soa

III.6.1. Echantillonnage

Les méthodes décrites dans le manuel « Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs » de l'OMS, 2003 ont été utilisées.

La collecte des échantillons s'est effectuée au mois d'avril, mai et septembre 2003 ; et au mois d'avril, mai et juin 2004.

III.6.1.1. Capture de nuit sur appâts humains

Les captures nocturnes de moustiques ont été effectuées à l'intérieur et à l'extérieur de deux maisons habitées. Les captures sont réalisées à partir de 18 heures jusqu'à 6 heures du matin par deux équipes composées de six captureurs. Le changement d'équipe se fait toutes les deux heures.

Cette méthode de capture permet :

- (1) d'identifier les espèces culicidiennes agressives pour l'homme,
- (2) d'évaluer le nombre de piqûres par homme et par nuit (**PHN**) ou le « **ma** » (taux d'agressivité) pour chaque espèce aggressive : correspondant au rapport entre le nombre total de moustiques capturés par le nombre total d'homme-nuits réalisés,
- (3) d'estimer le taux d'endophagie d'une espèce.

$$\text{Taux d'endophagie} = \frac{\text{ma intérieur}}{\text{ma intérieur} + \text{ma extérieur}} \times 100$$

ma intérieur = taux d'agressivité intérieur ou nombre de piqûres par homme et par nuits à l'intérieur de l'habitation humaine

ma extérieur = taux d'agressivité extérieur ou nombre de piqûres par homme et par nuit à l'extérieur de l'habitation humaine



Si le taux d'endophagie est supérieur à 50%, l'espèce est endophage.

Si le taux d'endophagie est inférieur à 50%, l'espèce est exophage.

(4) de déterminer l'âge physiologique (taux de parité) et la longévité de la population anophélienne (voir paragraphe III.6.2.b)

(5) d'évaluer le rythme d'agressivité des moustiques, de 18 heures à 6 heures.

III.6.1.2. Capture matinale en faune résiduelle

Des captures matinales des moustiques au repos dans les chambres à coucher ont lieu à partir de 5 heures. Dix maisons par site d'étude ont été choisies pour la capture.

La densité par case ou DPC est obtenue en divisant l'effectif de chaque espèce vectrice capturée au repos par le nombre total de cases visitées.

L'analyse des repas de sang en faune résiduelle permet d'observer la préférence trophique des vecteurs et d'évaluer leur taux d'anthropophilie.

III.6.1.3. Identification des espèces vectrices

▪ Espèces culicidiennes

L'identification est basée sur la morphologie des adultes (ailes, palpes, pattes, tergites). Cette identification nécessite une loupe binoculaire et l'utilisation de clés de détermination décrite par Grjebine en 1966 (Les Anophèles Malgaches) et par le CD-ROM de l'ORSTOM (les anophèles de la région Afro-tropicale) au laboratoire.



▪ *An. gambiae s.l.*

Identification morphologique

Pour cette espèce :

- les palpes sont lisses et à trois bandes pâles : la bande pâle apicale est large, la médiane est étroite et la basale est égale à la médiane (Figure 11).
- l'ensemble de l'aile est pâle, les taches claires sont étendues. La costa possède quatre taches claires principales et la première possède généralement une interruption claire sur la troisième tache sombre principale (Figure 8).
- les pattes : fémurs, tibias et le premier article des tarses sont au moins tachetés (Figure 10).

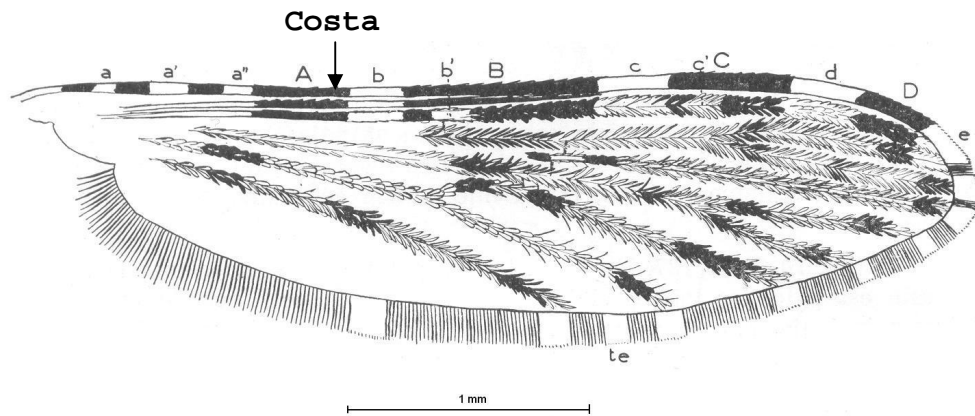


Figure 8 : Aile d'*An. gambiae s.l.* (Grejbine, 1966)

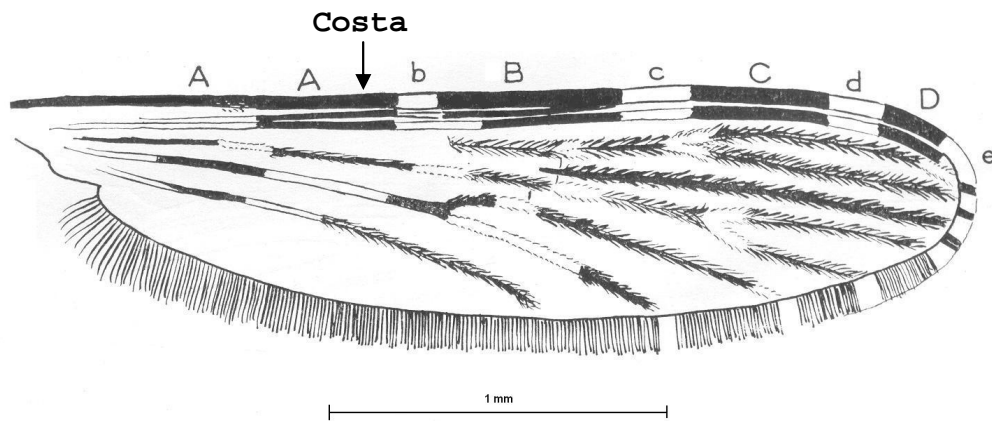


Figure 9 : Aile d'*An. funestus* (Grejbine, 1966)

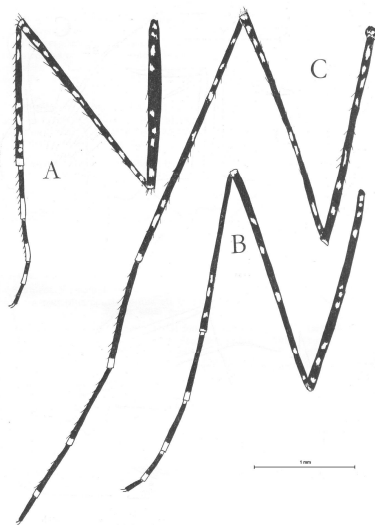


Figure 10 : Pattes d'*An. gambiae s.l.*
(Grejbine, 1966)

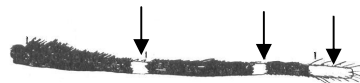


Figure 11 : Palpe d'*An. gambiae s.l.*
(Grejbine, 1966)



Figure 12 : Palpe d'*An. funestus*
(Grejbine, 1966)



▪ ***An. funestus***

Pour cette espèce :

- les palpes sont lisses à trois bandes pâles plus ou moins étroites, la dernière est apicale (Figure 12),
- les ailes sont à dominance d'écailles noires. La costa est à 4 taches claires principales. Toutes les taches claires sont plus courtes que les taches noires qui les séparent. La première nervure est comme la costa mais à base pâle. La coloration des taches alaires varie en fonction des régions et des saisons. La base de la costa peut être interrompue ou sans interruption ; la troisième nervure est sombre ou avec une interruption claire ; la base de la quatrième nervure est sombre ou claire ; la base de la sixième nervure est entièrement claire ou avec interruption sombre. Sur la frange alaire, il y a une tache claire en face de chaque veine sauf au niveau de la veine 6 (Figure 9).
- les pattes sont entièrement noires. Cependant, quelques écailles claires sont parfois décelables à la jointure des tibias et des tarses.

III.6.2. Traitement des moustiques sur le terrain

III.6.2.1. Conservation du matériel collecté

(1) Pour les femelles gorgées capturées en faune résiduelle, le sang est prélevé sur du papier filtre après dissection de l'abdomen. Le sang permettra de déterminer l'origine du repas sanguin par un test ELISA selon la méthode de Beier et al., 1988 ; Fontenille et al., 1989.

(2) La tête et le thorax des vecteurs potentiels ont été conservés individuellement dans un tube étanche contenant du silica-gel pour lutter contre l'humidité à basse température (-20°C) et seront testés par ELISA-CSP (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Circum Sporozoite Protein) pour la détection et la spéciation des protéines circum-sporozoïtaires



(Burkot et al., 1984; Wirzt et al., 1987). Cette méthode permettra d'évaluer l'indice sporozoïtique immunologique spécifique de l'espèce *Plasmodium*.

Les pattes et ailes d'*Anopheles gambiae* sont aussi conservées également à basse température dans des tubes étanches contenant du silica-gel. Elles vont permettre l'identification des espèces du complexe *An. gambiae* par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Scott et al., 1993).

III.6.2.2. Dissection des ovaires (figure 13)

Chaque moustique capturé sur appât humain ou capturé par aspiration à l'aide d'un aspirateur à bouche à l'intérieur de l'habitation, a fait l'objet d'une dissection de l'ovaire en vue de déterminer le taux de parité ou âge physiologique et la longévité de la population anophélienne étudiée.

$$\text{Taux de parité (\%)} = \frac{P}{N+P} \times 100$$

A partir de cette donnée et connaissant la durée du cycle gonotrophique (2,5 jours), le taux quotidien de survie moyen (p) des Anophèles vecteurs peut être calculé, d'après la formule de Davidson suivant

$$p = \sqrt[L]{\frac{P}{N+P}}$$

p = taux quotidien de survie

L = durée du cycle gonotrophique

P = Nombre de femelles pares

N = Nombre de femelles nullipares

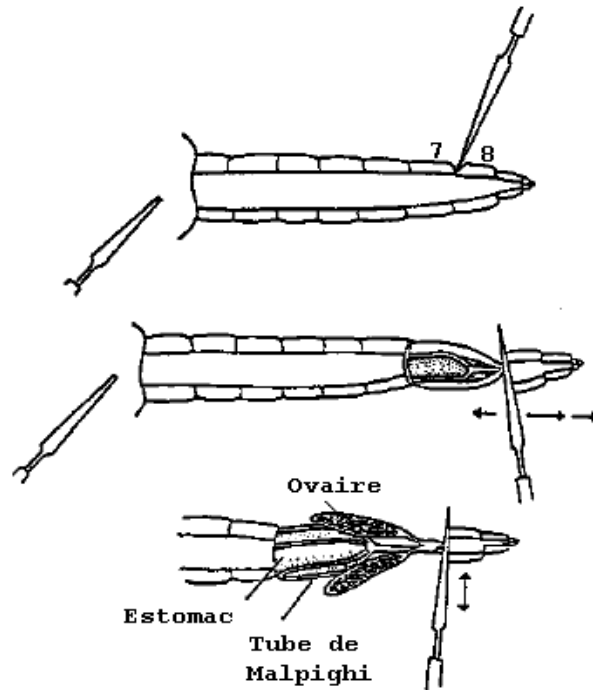
Le taux quotidien de survie "p" permet de suivre la dynamique des populations d'anophèles au fil des saisons. Il permet d'en déduire la probabilité journalière de survie au sein d'une population.



Les ovaires sont disséqués dans une goutte d'eau distillée, sous loupe binoculaire (grossissement x25 et x40). L'extraction n'est possible que sur un moustique frais.

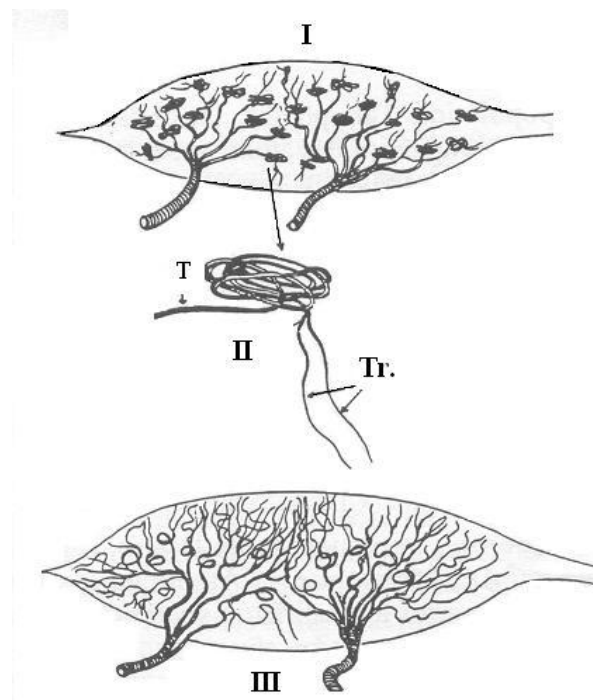
Avant la dissection, les moustiques sont tués aux vapeurs d'éther. Le moustique est couché sur le dos. On insère une minutie entre le 7^{ème} et 8^{ème} segment abdominal. L'extrémité de l'abdomen est ensuite étirée pour faire dégager et sortir les ovaires. La préparation est séchée à la température ambiante.

La détermination de la parité se fait par observation microscopique des trachéoles des ovaires, selon la méthode de Detinova (1963). Les trachéoles des ovaires pelotonnées avant la première ponte se distendent en un réseau chevelu lors de la ponte et ne reviennent pas à leur arrangement initial au cours des cycles suivants. Si les ovaires possèdent des trachéoles enroulées ou pelotonnées, la femelle est dite nullipare et pare si les trachéoles sont déroulées (figure 14).



(© OMS, 2003)

Figure 13: Dissection des ovaires



(© Mouchet et Carnevale, 1991)

Figure 14: Evolution des trachéoles ovariennes des Anophèles

I: Ovaire d'une femelle nullipare : système trachéolaire pelotonné

II: Extrémité pelotonnée d'un système trachéolaire

(T: trachée; Tr.: trachéole)

III : Ovaire d'une femelle pare : trachéoles sans peloton



III.6.3. **Epandage ou pulvérisation intra-domiciliaire**

L'épandage a pour but de réduire le contact homme-vecteur.

Son principe est basé sur le fait que la plupart des anophèles entrent dans les habitations pour piquer et vont ensuite se poser sur les parois intérieures des murs jusqu'au petit matin. La pulvérisation se fait au petit matin et couvre toutes les surfaces intérieures afin de tuer ces moustiques au repos.

L'épandage a été effectué au début du mois d'avril 2004 à partir 5 heures du matin (déterminé par les résultats des observations de l'éthologie des vecteurs) au moyen de pulvérisateurs à pression réglable de type **Hudson "X-Pert"** (figure 15 et 16).

La buse du pulvérisateur est à jet plat communément utilisée pour les pulvérisations murales parce que celle-ci produit un jet en éventail dont l'angle d'ouverture est de 80°, avec un débit de 757 ml par minute et une pression de 280kPa dans la cuve. Elle est généralement en acier inoxydable spécial. L'embout comporte deux méplats de part et d'autre de l'orifice pour faciliter le démontage.

Le personnel chargé de l'aspersion doit appliquer la suspension à un rythme qui permet de couvrir 19 m² par minute. Il délimite un rectangle de 3 m de hauteur et de 6,35 m de longueur et le diviser en neuf bandes verticales parallèles dont la première aura 75 cm de largeur et les suivantes 70 cm (Figure 17). En tenant la buse à 45 cm du mur, on obtient une plage d'aspersion de 75cm (Figure 18). Il faut qu'il y ait 45 cm entre l'embout de la buse et l'extrémité de la baguette, puis il tend le bras droit et se penche vers la surface du mur tout en levant et en baissant alternativement le bras de façon que l'extrémité de la baguette reste en contact avec le mur. Pour des raisons de sécurité, il porte également des gants et des masques de protection.



Durant l'épandage, les propriétaires de chaque maison ont été invités à sortir pour éviter toutes intoxications aux extraits de plantes.

Les deux extraits de plantes (PKT et RDO II) sont des produits bruts à l'état sec, à diluer dans de l'eau distillée et d'éthanol (moitié/moitié) et bien mélangées pour éviter les floculations en respectant les CL_{90} respectifs obtenus au laboratoire.

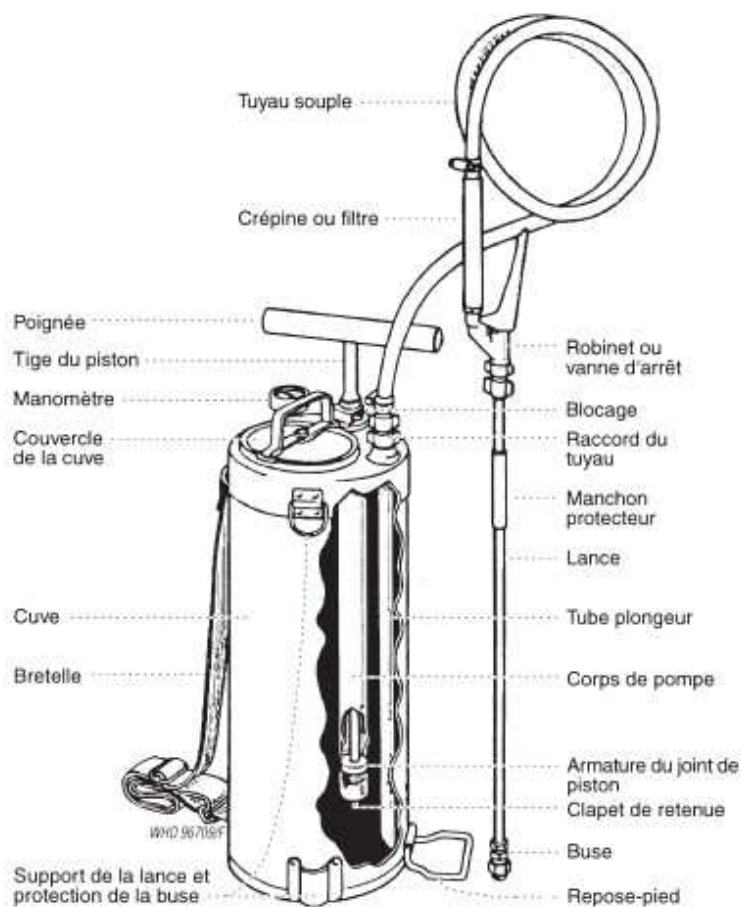
Quelques maisons du village de Marozevo et de Soa ont bénéficié de ces aspersions intradomiciliaires par deux extraits bruts de plantes, l'une codée RDO II et l'autre codée PKT. Le village de Beforona a été considéré comme site témoin du début jusqu'à la fin du sous-projet.

Après les aspersions, les enquêtes entomologiques se sont succédées à un rythme mensuel jusqu'au mois de juin 2004. Les enquêtes cliniques et parasitologiques portant sur la population des trois villages ont lieu à chaque descente sur terrain, soit avril, mai et septembre 2003; avril, mai et juin 2004.



(Photo : Fano Randrinambinintsoa, © 2004)

Figure 15 : Photo d'un pulvérisateur à main à pression préalable



(© OMS)

Figure 16 : Vue éclatée d'un pulvérisateur à main à pression préalable

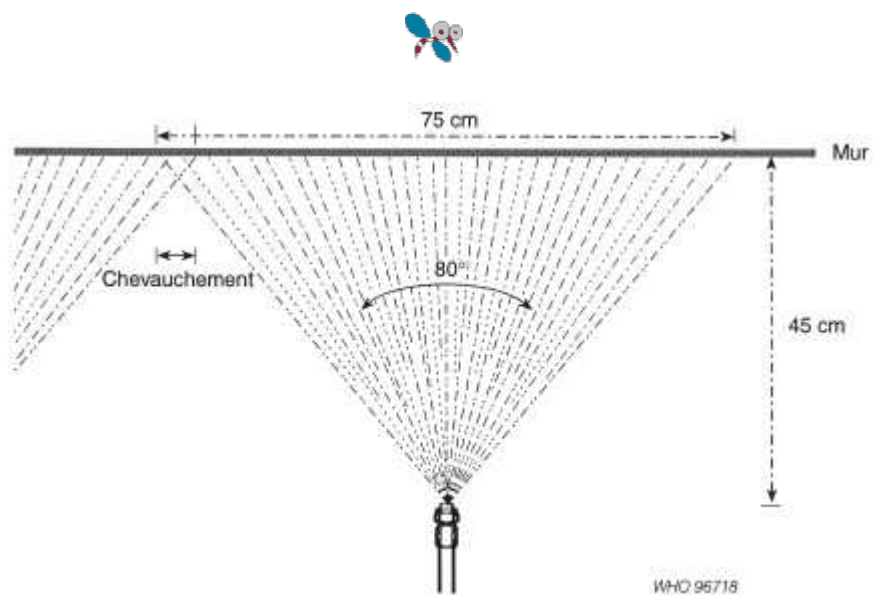


Figure 17 : Répartition du jet et distance par rapport au mur
(© OMS)

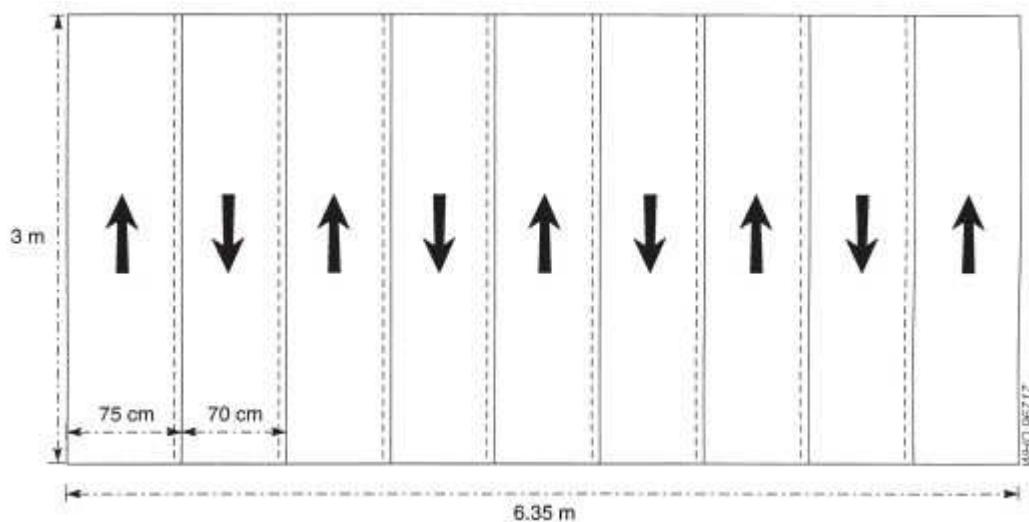


Figure 18 : Méthode de pulvérisation des insecticides sur le mur
(© OMS)



III.7. Etude d'impact des insecticides

L'analyse des effets des insecticides biologiques sur la population anophélienne vectrice du paludisme est faite sur *An. funestus* et les espèces du complexe *An. gambiae s.l.* formé par *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* et suivant la région où ces espèces sont présentes. D'une manière générale, la présente analyse est effectuée sur les vecteurs du paludisme capturés au cours de la capture matinale.

III.7.1. Effet du traitement

Les fluctuations de la densité par case ou moyenne des espèces vectrices par habitation sont étudiées en fonction de la pulvérisation dans chaque site. Il s'agit d'analyser la densité par case (DPC) avant et après l'épandage dans les sites traités par rapport à celle du site témoin (village de Beforona) ; de comparer de DPC d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* dans le site traité avant et après la pulvérisation intradomiciliaire des insecticides : à Marozevo village traité par PKT et à Soa village traité par RDO II.

Les périodes de relevés sont réparties comme suit dans la zone d'intervention:

- période avant épandage (avril 2003, mai 2003 et septembre 2003)
- période après épandage (avril 2004, mai 2004 et juin 2004)

III.7.2. Analyse statistique : comparaison de la densité par case par le test T de Student

Le test de Student permet de comparer la moyenne d'un échantillon à une valeur donnée de deux échantillons indépendants ou de deux échantillons appariés à distribution normale.

Le test de Student permet de voir si la densité par case des espèces vectrices du paludisme capturées au cours de la



capture matinale dans une même zone est identique avant et après le traitement d'insecticide biologique.

Pendant l'analyse, l'hypothèse H_0 est :

- H_0 : la densité par case des espèces vectrices du paludisme n'est pas identique avant et après l'épandage.

Si la valeur calculée de T est inférieure à la valeur de T donnée par la table de Student, l'hypothèse principale H_0 est rejetée et l'hypothèse alternative H_1 est acceptée.

Si la valeur calculée de T est supérieure à celle de la table de Student, l'hypothèse H_0 est acceptée.

III.7.3. Procédure de calcul

La valeur de T calculé est calculée suivant la variable aléatoire de Student à $(v = n_1 + n_2 - 2)$ degré de liberté (ddl).

$$T_{\text{calculé}} = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{S_p^2}{n_1} + \frac{S_p^2}{n_2}}}$$

où x_1 et x_2 sont les moyennes des deux échantillons, S_p^2 est la variance commune et n est le nombre d'échantillon.

Cette dernière statistique correspond à la variance S_p^2 de la population. Elle est égale à :

$$S_p^2 = \frac{SCE_1 + SCE_2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} = \frac{SCE_1 + SCE_2}{n_1 + n_2}$$

Où SCE est la somme des carrés des écarts :

$$SCE = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$



La valeur de T est comparée à la valeur critique appropriée de T (dans la table de Student) avec $(n_1 + n_2 - 2)$ degrés de liberté.

L'hypothèse H_0 est rejetée si la valeur absolue de $T_{\text{calculé}}$ est supérieure à cette valeur critique. S'il s'agit d'un test bilatéral, nous prendrons la valeur T_{ddl} .

III.7.4. Interprétation des résultats : évaluation des effets du traitement insecticide biologique sur la population culicidienne en particulier les vecteurs du paludisme

Dans les deux zones d'intervention, on suppose que l'état de la population dans le site témoin devrait être identique à celui du site traité en absence d'épandage sauf les variations observées avant traitement entre le site témoin et les sites traités sont dues à l'effet des facteurs naturels qu'on ne peut pas maîtriser. Celles obtenues après le traitement entre le site témoin et les sites traités permettent d'évaluer l'effet de l'insecticide biologique en tenant compte des résultats obtenus avant traitement.



IV.RESULTATS

IV.1. Recherche bibliographique et liste des plantes à vertus insecticides

Seize plantes ont été relevées dans plusieurs ouvrages, dans des sites Internet et d'après les enquêtes ethnobotaniques.

Ces plantes sont connues et utilisées par les villageois contre les insectes nuisibles, parasites et/ou ravageurs de la culture. Quelques unes d'entre elles sont déjà employées dans la lutte contre les vecteurs de maladie comme le paludisme et/ou la filariose et les autres sont déjà étudiées au laboratoire mais leur efficacité sur le terrain reste à vérifier.

Le tableau 3 ci-après montre la liste des plantes qui ont des vertus insecticides et sont déjà utilisées par d'autres chercheurs dans la lutte antivectorielle aussi bien imagocide que larvicide.



Tableau 3: Liste des plantes ayant les capacités insecticides

| N° | Famille de la plante | Localisation | Partie de la plante utilisée | Source |
|----|--|-------------------------------------|------------------------------|---|
| 1 | <i>Ocimum americanum</i> (Labiatacées) | Hautes terres Centrales (HTC) | Feuille | Bibliographie (Seyoum A. et al., 2002) |
| 2 | <i>Lantana camara</i> (Verbénacées) | Partout | Feuille et tige | |
| 3 | <i>Lippia uckambensis</i> (Verbénacées) | | Feuille et tige | |
| 4 | <i>Ocimum kilimandscharicum</i> (Labiatacées) | | Feuille | |
| 5 | <i>Ocimum suave</i> (Labiatacées) | | Feuille | |
| 6 | <i>Corymbia citriodora</i> (myrtacées) | | Feuille | |
| 7 | <i>Tagetes minuta</i> (Asteracées) | Partout | Feuille et fleur | |
| 8 | <i>Hyptis suaveolens</i> (Lamiacées) | | Feuille | |
| 9 | <i>Annona squamosa</i> (Annonacées) | Sud - Est | Graine et feuille | |
| 10 | <i>Azadirachta indica</i> (Meliacées) | HTC | Feuille | Internet |
| 11 | Euphorbiacées | HTC, Sud | Feuille et tige | Enquête ethnobotanique dans la zone d'intervention |
| 12 | Ranunculacées | | Feuille | |
| 13 | Agavacées | | Feuille | |
| 14 | Rombeliacées | HTC, Nord | Feuille et tige | |
| 15 | Poacées | HTC | Feuille | |
| 16 | Sarracéniacées | | Feuille et tige | |



IV.2. Choix des plantes

Certaines de ces plantes (Tableau 4) sont recommandées par les populations locales suite aux résultats satisfaisants obtenus après leurs utilisations. D'autres sont choisies d'après les informations bibliographiques.

Huit plantes ont été collectées dont une dans la suburbaine d'Antananarivo, une deuxième à Andriampamaky (Fivondronana de Manjakandriana), une troisième à Manakara et les cinq dernières à Ambatofinandrahana. Ces plantes sont choisies suivant leur localisation géographique, la facilité d'accès à chaque zone de collecte et les études antérieures menées sur ces plantes.

Une fois arrivées au laboratoire, les plantes sont codées selon le répertoire du laboratoire d'accueil pour faciliter le travail au cours de chaque manipulation.

Tableau 4: liste des plantes codées et leur lieu de collecte respective

| N° | Liste des plantes codées | Lieu de collecte |
|----|--------------------------|-------------------------|
| 1 | ST 667 | Ambatofinandrahana |
| 2 | ST 668 | |
| 3 | ST 669 LFD | |
| 4 | ST 669 LFW | |
| 5 | ST 670 | |
| 6 | PKT | Andriampamaky |
| 7 | RDO II | Antananarivo Suburbaine |
| 8 | MNKR | Manakara |

D'après les populations locales ces plantes sont utilisées : soit pour la lutte contre les insectes ravageurs de cultures soit pour la lutte contre les parasites de la peau de l'homme et des animaux soit pour la pharmacopée traditionnelle (plaies, gales, maladies de la peau, maux de dents,...) soit contre les puces et les poux.



ST 667 est recommandée par les villageois pour lutter contre les maux de dents.

ST 668 et ST 670 sont utilisées pour lutter contre les tiques de bétail. Ces plantes sont broyées puis diluées dans de l'eau pour laver la peau des bœufs parasitée par les tiques. ST 668 est hautement toxique pour l'homme car l'ingestion de cette plante ou l'ingestion de chrysalides après la métamorphose des chenilles qui se nourrissent de cette plante peut entraîner la mort.

ST 669 est réputée par sa vertu anti-poux et antipelliculaire.

PKT sert à lutter contre les insectes parasites (connu sur les HTC sous le nom de « tsatoka ») qui détruisent les racines des patates douces ou des pommes de terre. Pour cela, cette plante est mélangée aux engrais. Elle sert également à lutter contre les poux des cheveux et les puces.

RDO II est déjà étudiée au laboratoire par Rabeniala (25) en 2002 par ses propriétés larvicides et imagocides des moustiques vecteurs de la filariose (*Culex quinquefasciatus*) et vecteurs du paludisme (*An. arabiensis*).

MNKR est recommandée par une personne venant de Manakara par sa propriété répulsive des moustiques dans la région.



IV.3. Extraction chimique

IV.3.1. Extraction éthanolique (tableau 5)

Le rendement obtenu après l'extraction alcoolique à l'éthanol varie de 0,78% (ST 670) à 8,83% (PKT) suivant la plante.

Tableau 5: Rendement de ces extractions éthanoliques

| Extrait | Quantité macérée (grammes) | Extrait alcoolique (grammes) | Rendement (%) |
|--------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------|
| ST 667 | 655,35 | 46,64 | 7,12 |
| ST 668 | 1529,99 | 110,94 | 7,26 |
| ST 669 (Lfd) | 1435,16 | 51,27 | 3,57 |
| ST 669 (Lfw) | 1596,78 | 47,89 | 2,99 |
| ST670 | 1534,73 | 120,04 | 0,78 |
| PKT | 530,00 | 46,78 | 8,83 |
| MNKR | 1611,30 | 105,02 | 6,58 |

Le faible rendement est dû au fait que peu de constituants sont soluble dans l'alcool (éthanol) pour ST 670. Par contre, pour la plante PKT, une partie de ses constituants est soluble à l'éthanol.

IV.3.2. Extrait des fractions aqueuses et hexaniques

Les extraits obtenus pour chaque plante (tableau 6) ne représentent que quelques grammes du poids total des plantes sèches broyées (11,21% à 1,16%).

Les extraits sont conservés dans des boîtes hermétiquement fermées à basse température (inférieure à 5°C) prêtes pour le test de sensibilité des moustiques.



Tableau 6: Rendement des extractions hexaniques et des fractions aqueuses

| Extrait | Quantité de la plante (gramme) | Extrait hexanique (gramme) | Lyophilisat (gramme) | Rendement (%) |
|---------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------|
| PKT | 1620 | - | 181,68 | 11,21 |
| RDO II | 2100 | 24,31 | - | 1,16 |

IV.4. Collecte et élevage des moustiques

Le tableau 7 suivant montre le nombre total de moustiques collectés et obtenus au cours de l'élevage.

Tableau 7 : Effectif total de moustiques élevés en insectarium

| Lots de moustiques | Nombre de moustiques collectés | Nombre d'oeufs | Nombre de moustiques obtenus | Durée du cycle de développement (jours) |
|--------------------|--------------------------------|----------------|------------------------------|---|
| A | 36 | 410 | 200 | 10 à 15 |
| B | 50 | 705 | 473 | 10 à 13 |
| C | 76 | 1150 | 645 | 7 à 12 |
| D | 112 | 1200 | 936 | 7 à 12 |
| E | 34 | 570 | 340 | 7 à 12 |
| F | 21 | 380 | 190 | 7 à 12 |
| TOTAL | 329 | 4415 | 2784 | |

A une température comprise entre 24 et 29°C, les durées du cycle imaginal d'*An. Arabiensis*, élevé en insectarium, sont de 10 à 15 jours pour la génération A et B et de 7 à 12 jours pour C, D, E et F. Au début de la mise en place de l'insectarium, le cycle de développement est long car des fois, le chauffage n'est pas continu (coupure de la résistance). Mais après l'obtention des matériels fournis par le sous-projet, la température et l'humidité ont été maintenues constantes et identiques à celles des conditions du milieu naturel.



Le rendement global obtenu de l'élevage en insectarium est de 63,03 %.

Au cours de chaque test de sensibilité des moustiques aux produits (référence OMS ou extrait des plantes), 20 moustiques sont nécessaires pour chaque tube d'exposition constitué par un tube témoin et des tubes pour chaque concentration.

18 tests ont été réalisés soit 3740 moustiques utilisés.

Le nombre de moustiques issus de l'élevage a pu suffir au nombre de moustiques requis pour les tests au laboratoire.

IV.5. Test de sensibilité des moustiques

IV.5.1. Aux produits de références OMS

Afin de comparer l'efficacité de chaque extrait de plante sur les adultes d'*An. arabiensis*, des tests de sensibilité sur les produits de référence OMS ont été réalisés : Fenitrothion, malathion et DDT. Le tableau 8 ci-après montre les résultats de ces tests.

Tableau 8: Test de sensibilité sur les produits de référence OMS

| Témoin | Fenitrothion | Malathion | D.D.T. |
|--------|--------------|-----------|--------|
| 0% | 100 % | 100 % | 100 % |

Sur ces produits de référence OMS, les taux de mortalité sont de 100% pour 20 moustiques pour un contact de 1 heure. Ces moustiques ne présentent aucune résistance à ces insecticides chimiques

IV.5.2. Aux extraits de plantes

Les tests sur les adultes d'*An. arabiensis* ont été effectués à partir des extraits bruts, éthanoliques, hexaniques, chloroformiques et aqueuses (lyophilisat) de quelques plantes.



Remarque: Pour chaque extrait de plante, un extrait est acceptable pour l'épandage sur le terrain si le test de toxicité au laboratoire donne un taux de mortalité supérieur ou égal à 50% sur les insectes testés pour une faible concentration de l'extrait testé (1,25mg/cm²).

Tableau 9: Test de sensibilité sur les extraits bruts

| Témoin (Sans extraits) | Extraits | 0,5 mg/cm ² (%) | 1 mg/cm ² (%) | 2,5 mg/cm ² (%) |
|---------------------------|--------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 0 | ST 667 | 10 | 25 | - |
| 0 | ST 668 | 10 | 20 | 15 |
| 0 | ST 669 (Lfd) | 5 | 10 | 10 |
| 0 | ST 669 (Lfw) | 10 | - | 65 |
| 0 | ST 670 | 15 | 15 | 5 |
| 0 | MNKR | 0 | 0 | 0 |

ST 667, ST 668 et ST 670 ont un taux de mortalité ne dépassent pas 25%. Les autres extraits présentent un taux de mortalité encore plus faible. Ces trois plantes ne sont pas ou sont très peu toxiques sur les adultes d'*An. arabiensis*.

Seul l'extrait de la plante ST 669 (Lfw) présente 65% de mortalité. Cet extrait a mérité une étude approfondie et a subi une extraction par partage liquide/liquide avec de l'hexane du chloroforme et de l'eau distillée.

Tableau 10: Test de sensibilité sur ST 669 après partage liquide/liquide

| Témoin (Sans extraits) | Extraits | Fraction | 0,5 mg/cm ² (%) | 1 mg/cm ² (%) |
|---------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 5 | ST 669 (Lfd) | Hexanique | 25 | 20 |
| 5 | | Chloroformique | 20 | 5 |
| 5 | | Lyophilisat | 15 | 0 |
| 5 | ST 669 (Lfw) | Hexanique | 0 | 15 |
| 5 | | Chloroformique | 10 | 10 |
| 5 | | Lyophilisat | 0 | 0 |



Chaque extrait (Tableau 10) ne présente que 15 à 25% de mortalité. En plus de ce faible taux de mortalité, le tube d'exposition du témoin présente 20% de mortalité due à une souillure du tube ou du papier d'exposition. Le test a été refait et a donné les résultats présentés au tableau suivant

Tableau 11: Test de sensibilité sur ST 669 après partage liquide/liquide

| Témoin (Sans extraits) | Extraits | Fraction | 0,5 mg/cm² (%) | 1 mg/cm² (%) |
|---|---------------------|-----------------|--|--|
| 0 | ST 669 (Lfd) | Hexanique | 0 | 10 |
| 0 | | Chloroformique | 0 | 0 |
| 0 | | Lyophilisat | 0 | 0 |

Après la réalisation du nouveau test sur ST 669 (Lfd) (Tableau 11), la fraction hexanique présente un taux de mortalité de 10% à 1mg/cm². Tous les autres extraits ne présentent aucune toxicité.

On peut conclure que la plante codée ST 669 est peu toxique pour les imagos d'*An. arabiensis*.

La plante codée PKT collectée dans la partie Nord de la Haute Terre centrale est employée par les villageois pour protéger la culture des insectes nuisibles et lutter contre les poux des cheveux et la puce.



En testant l'extrait brut de cette plante aucun résultat n'est obtenu (tableau 12).

Tableau 12: Test de sensibilité sur la plante PKT (extrait brut)

| Témoin (Sans extraits) | Concentration | 0,5 mg/cm ² | 1 mg/cm ² | 3 mg/cm ² |
|---------------------------|---------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| 0 | TM (%) | 0 | 0 | 0 |

Malgré ce résultat non satisfaisant sur les extraits bruts, le partage liquide-liquide a été fait pour vérifier les résultats des enquêtes ethnobotaniques sur le terrain. Le tableau 13 ci-dessous montre les résultats suivant le type d'extrait.

Tableau 13: Test de sensibilité de la plante PKT après partage liquide/liquide

| Témoin (Sans extraits) | Extraits | Fraction | 0,5 mg/cm ² (%) | 1 mg/cm ² (%) | 2,5 mg/cm ² (%) |
|---------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 0 | PKT | Hexanique | 0 | 0 | 0 |
| 0 | | Chloroformique | 0 | 10 | 35 |
| 0 | | Ethanol | 0 | 0 | 0 |
| 0 | | Lyophilisat (test 1) | 0 | 20 | 40 |
| 0 | | Lyophilisat (test 2) | 5 | 10 | 45 |
| 0 | | Lyophilisat (test 3) | 20 | 30 | 45 |

Les extraits hexanique et éthanolique de PKT ne sont pas toxiques pour les imagos d'*An. arabiensis*.

La fraction chloroformique de PKT est légèrement toxique avec 10 à 35% de mortalité.

La fraction aqueuse testée trois fois donne un résultat de 8,33% à 0,5 mg/cm²; 20% à 1 mg/cm² et **43,33% à 2,5 mg/cm²**. Ce résultat est probant pour un essai sur le terrain. Un essai de pulvérisation intradomiciliaire a été faite dans le village de Marozevo dans la commune rurale de Beforona.

La CL₅₀ et CL₉₀ de PKT sont respectivement de 3,49 mg/cm² et de 5,78 mg/cm².



Les résultats de la fraction hexanique de la plante codée RDO II sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Test de sensibilité de la plante RDO II: extrait hexanique (Nombre de moustique au départ: 20)

| Témoin (Sans extraits) | Test | 0,46 mg/cm ² | 1,33 mg/cm ² | 3,13 mg/cm ² |
|---------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 1 | 15 | 20 | 20 |
| 0 | 2 | 11 | 20 | 20 |
| 0 | Moyenne | 13 | 20 | 20 |
| 0 | % | 65 | 100 | 100 |

A une faible concentration de 0,46 mg/cm², l'extrait hexanique de la plante présente un taux de mortalité de 65%. A une concentration de 3,13 mg/cm², la mortalité est de 100%. Le test a été répété 2 fois.

D'après ces résultats, la CL₅₀ de RDO II est de 0,19 mg/cm² et la CL₉₀ de 2,66 mg/cm².

Ainsi, ce taux obtenu peut être utilisé pour un essai de pulvérisation intradomiciliaire.



IV.6. Travaux sur le terrain à Beforona, Marozevo et Soa

IV.6.1. Capture de nuit sur appât humain

(1) espèces culicidiennes agressives pour l'homme

Au cours des 11 séances de captures :

A BEFORONA (Tableau 15)

Sur les 48 hommes-nuits répartis en 24 hommes-nuits à l'intérieur et 24 hommes-nuits à l'extérieur : 1831 moustiques femelles ont été récoltés. 1375 appartiennent au genre *Anopheles* (soit 75,10% des moustiques capturés) dont 884 anophèles vecteurs potentiels (soit 64,29% des anophèles collectés). Le moustique vecteur est dominé par *An. gambiae s.l.* suivi par *An. mascarensis* et enfin *An. funestus* (tableau 15).

Tableau 15: Répartition par espèces des moustiques capturés à Beforona

| | | Beforona | | | |
|--------------------|-----------------------------|------------|-------|-------------|-------|
| | | Intérieur | | Extérieur | |
| Sous-Famille | Espèces | Effectif | % | Effectif | % |
| ANOPHELINAE | <i>An. coustani</i> | 30 | 10,49 | 429 | 27,77 |
| | <i>An. squamosus</i> | 4 | 1,40 | 28 | 1,81 |
| | <i>An. funestus</i> | 8 | 2,80 | 11 | 0,71 |
| | <i>An. gambiae s.l.</i> | 113 | 39,51 | 587 | 37,99 |
| | <i>An. mascarensis</i> | 21 | 7,34 | 144 | 9,32 |
| CULICINAE | <i>Cx. antennatus</i> | 42 | 14,69 | 142 | 9,19 |
| | <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 24 | 8,39 | 49 | 3,17 |
| | <i>Mansonia uniformis</i> | 44 | 15,38 | 155 | 10,03 |
| Total | | 286 | | 1545 | |

La famille des Culicinae est représentée par 3 espèces: *Cx. antennatus*, *Cx. quinquefasciatus* et *Mansonia uniformis* (tableau 15).



A MAROZEVO (Tableau 16)

Sur les 42 hommes-nuits répartis en 27 hommes-nuits à l'intérieur et 15 hommes-nuits à l'extérieur : 1950 moustiques femelles ont été capturés dont 1525 anophèles (78,20% des moustiques totaux capturés) et 799 vecteurs potentiels soit 52,39% des anophèles totaux collectés. *An. gambiae s.l.* a été l'espèce vectrice dominant, suivie par *An. mascarensis* et *An. funestus* (tableau 16).

Tableau 16: Répartition par espèces des moustiques collectés à Marozevo

| | | Marozevo | | | |
|--------------|-----------------------------|------------|-------|-------------|-------|
| | | Intérieur | | Extérieur | |
| Sous-Famille | Espèces | Effectif | % | Effectif | % |
| ANOPHELINEAE | <i>An. Coustani</i> | 41 | 4,43 | 226 | 22,07 |
| | <i>An. Pauliani</i> | 1 | 0,11 | – | – |
| | <i>An. Squamosus</i> | 1 | 0,11 | 7 | 0,68 |
| | <i>An. Funestus</i> | 27 | 2,92 | 5 | 0,49 |
| | <i>An. gambiae s.l.</i> | 471 | 50,86 | 296 | 28,91 |
| | <i>An. mascarensis</i> | 260 | 28,08 | 187 | 18,26 |
| | <i>An. maculipalpis</i> | – | – | 3 | 0,29 |
| CULICINAE | <i>Cx. Antennatus</i> | 41 | 4,43 | 139 | 13,57 |
| | <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 41 | 4,43 | 11 | 1,07 |
| | <i>Aedes sp.</i> | 1 | 0,11 | 1 | 0,10 |
| | <i>Mansonia uniformis</i> | 42 | 4,54 | 149 | 14,55 |
| Total | | 926 | | 1024 | |

4 espèces de Culicinae ont été inventoriées: *Cx. antennatus* et *quinquefasciatus*, *Aedes* et *Mansonia uniformis*. Leur proportion à l'intérieur de l'habitation humaine tourne autour de 4,40% sauf pour le genre *Aedes*, le moins représenté avec 1% (tableau 16). *Aedes* n'a pas été récolté dans les autres sites.



A SOA (Tableau 17)

Sur les 12 hommes-nuits repartis en 10 hommes-nuits à l'intérieur et 2 hommes-nuits à l'extérieur : 760 moustiques femelles ont été récoltés. 613 individus appartiennent au genre *Anopheles* (80,66% de l'effectif totaux des moustiques capturés). Parmi les anophèles, 510 individus sont des vecteurs potentiels soit 83,20% des anophèles capturés à Soa. Le moustique vecteur dominant est *An. gambiae s.l.*, suivi par *An. mascarensis* et *An. funestus*

Tableau 17: Répartition par espèces des moustiques collectés à Soa

| | | Soa | | | |
|--------------------|--------------------------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | | Intérieur | | Extérieur | |
| Sous-Famille | Espèces | Effectif | % | Effectif | % |
| ANOPHELINAE | <i>An. Coustani</i> | 24 | 4,46 | 77 | 34,68 |
| | <i>An. Pauliani</i> | 1 | 0,19 | - | - |
| | <i>An. Squamosus</i> | 1 | 0,19 | - | - |
| | <i>An. Funestus</i> | 5 | 0,93 | 0 | 0 |
| | <i>An. Gambiae s.l.</i> | 189 | 35,13 | 66 | 29,73 |
| | <i>An. Mascarensis</i> | 206 | 38,29 | 44 | 19,82 |
| CULICINAE | <i>Cx. Antennatus</i> | 22 | 4,09 | 14 | 6,31 |
| | <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 69 | 12,83 | 8 | 3,60 |
| | <i>Coquilletidia</i> | 1 | 0,19 | 1 | 0,45 |
| | <i>Mansonia uniformis</i> | 20 | 3,72 | 12 | 5,41 |
| Total | | 538 | | 222 | |

La famille des Culicinae récoltée est représentée par 4 espèces, *Cx. antennatus* et *quinquefasciatus*, *Coquilletidia* et *Mansonia uniformis*. *Cx quinquefasciatus* est l'espèce la plus représentée. *Coquilletidia* est peu représenté et n'a été collecté que dans ce site (Tableau 17).

Remarque: À Marozevo et à Soa, la capture nocturne à l'extérieur de la maison a été arrêtée à partir du mois d'avril 2004 (mois où l'on a fait l'épandage). Seule la capture à l'intérieur de la maison a été effectuée aux mois de mai et juin 2004 à cause de l'insuffisance de matériels.



(2) Ethologie des vecteurs

a. Evaluation du nombre de piqûre par homme par nuit ou PHN à partir des captures de nuit sur appâts humains

Le taux d'agressivité ou nombre de piqûre par homme par nuit est obtenu par le rapport entre le nombre total de moustiques capturés et le nombre total de personnes utilisées comme appâts (cf paragraphe IV.6.1.).

• *An. gambiae s.l.* (tableau 18)

Le tableau suivant montre le nombre de PHN d'*An. gambiae s.l.* dans chaque site d'étude.

Tableau 18: Nombre de piqûre reçue par homme et par nuit (PHN)

| Sites | Beforona | | Marozevo | | Soa | |
|-------------|----------|-------|----------|-------|-------|-----|
| Emplacement | Int | Ext | Int | Ext | Int | Ext |
| ma (PHN) | 4,71 | 24,46 | 17,44 | 19,73 | 18,9 | 33 |
| TE (%) | 16,14 | | 46,92 | | 36,42 | |

A Beforona, *An. gambiae s.l.* est plus agressif à l'extérieur (24,46 PHN) qu'à l'intérieur (4,71 PHN). Cette espèce est 6 fois plus agressive à l'extérieur qu'à l'intérieur. Donc, les habitants reçoivent beaucoup plus de piqûres de moustique à l'extérieur qu'à l'intérieur de leur habitation.

A Marozevo, les piqûres d'*An. gambiae s.l.* reçues par homme et par nuit à l'intérieur (17,44 PHN) sont presque identiques à celles de l'extérieur (19,73 PHN).

A Soa, *An. gambiae s.l.* pique beaucoup plus à l'extérieur (33 PHN) qu'à l'intérieur (18,9 PHN) de l'habitation humaine. Cette espèce est presque 2 fois plus agressive à l'extérieur qu'à l'intérieur de la maison.



- **An. funestus (tableau 19)**

Le nombre de piqûre par homme par nuit ou taux d'agressivité d'*An. funestus* est présenté dans le tableau ci-après.

Tableau 19: Taux d'agressivité d'*An. funestus* dans les sites étudiés

| Sites | Beforona | | Marozevo | | Soa | |
|-------------|----------|------|----------|------|-----|-----|
| Emplacement | Int | Ext | Int | Ext | Int | Ext |
| ma (PHN) | 0,33 | 0,46 | 1 | 0,33 | 0,5 | - |
| TE (%) | 42,11 | | 75 | | - | |

An. funestus semble être un vecteur secondaire du paludisme dans les trois sites étudiés. Elle est nettement moins représentée qu'*An. gambiae s.l.*

A Beforona, le taux d'agressivité est légèrement supérieur à l'extérieur (0,46 PHN) qu'à l'intérieur (0,33 PHN) de l'habitation humaine.

A Marozevo, il est 3 fois plus agressif à l'intérieur (1 PHN) qu'à l'extérieur (0,33 PHN).

Les habitants de Soa reçoivent 0,5 PHN à l'intérieur au cours de la nuit.

b. Endophagie

L'endophagie est évaluée par le pourcentage de femelles capturées à l'intérieur des habitations.

- **An. gambiae s.l. (tableau 18)**

Dans les deux sites (Beforona et Soa), le taux d'endophagie est inférieur à 50%, donc *An. gambiae s.l.* est exophage car elle pique beaucoup plus à l'extérieur qu'à l'intérieur. Mais à Marozevo, cette espèce pique aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur. Elle est endophage.



- **An. funestus (tableau 19)**

A Beforona, le taux d'endophagie est de 42,11%. Dans ce site, cette espèce pique à l'extérieur de l'habitation humaine. Elle est exophage.

A Marozevo, ce taux s'élève à 75%, donc l'espèce est endophage c'est-à-dire elle pique beaucoup plus à l'intérieur qu'à l'extérieur.

c. Taux de parité et longévité (ou taux quotidien de survie)

L'étude du taux de parité et de la longévité de l'espèce vectrice a été réalisée à partir de la faune agressive pour l'homme.

Le taux de parité des femelles peut être estimé en examinant les ovaires après dissection, ce qui permet de calculer le taux de parité ou pourcentage de femelles ayant pondu au moins une fois au cours d'un cycle gonotrophique. Ce taux de parité varie suivant l'espèce.

- **An. gambiae s.l.**

Le tableau ci-après montre le taux de parité et le taux quotidien de survie ou longévité.

Tableau 20 : Taux de parité et longévité d'An. gambiae s.l.

| Site | | Beforona | Marozevo | Soa |
|------------------------------|-----------|----------|----------|-------|
| Taux de parité (%) | Intérieur | 40,71 | 39,92 | 43,92 |
| | Extérieur | 42,59 | 34,46 | 18,18 |
| Taux de parité moyen (%) | | 41,65 | 37,19 | 31,05 |
| Taux quotidien de survie (%) | | 70,44 | 67,28 | 61,26 |

A Beforona, le taux de parité de la faune endophage est de 40,71% et de 42,59% pour la faune exophage. Cette différence n'est pas significative ($X^2 = 0,34$, $p \leq 1$). Donc, le taux de parité d'An. gambiae s.l. est identique aussi bien à



l'extérieur qu'à l'intérieur. Le taux de parité moyen est de 41,65% c'est-à-dire 41,65 femelles ont pondu au moins une fois dans ce site. Ce dernier permet de calculer le taux quotidien de survie qui est de 70,44% pour un cycle gonotrophique de 2,5 jours.

A Marozevo, pour la faune endophage, les taux de parité sont de 39,92% et de 34,46% pour la faune exophage. Cette différence est non significative ($X^2 = 0,53$, $p \leq 1$). Donc, le taux de parité des moustiques capturés en faune agressive à l'extérieur et à l'intérieur de l'habitation humaine sont le même. Le taux moyen de parité des femelles qui ont pondu au moins une fois est de 67,28%. On en déduit le taux quotidien de survie évalué à 67,28% pour un cycle gonotrophique de 2,5 jours.

A Soa, le taux de parité à l'intérieur et à l'extérieur d'*An. gambiae s.l.* sont respectivement de 43,92% et 18,18%. Cette différence est significative ($X^2 = 5,18$, $p \leq 0,025$). Donc, le taux de parité de faune endophage est beaucoup plus élevé que celui de la faune exophage. En calculant le taux de parité moyen, 31,05% des femelles ont pondu au moins une fois. Le taux quotidien de survie est de 61,26% pour 2,5 jours de cycle gonotrophique.

Pour les trois sites étudiés, le taux quotidien de survie de cette population d'*An. gambiae s.l.* varie d'un site à un autre et ce taux est supérieur à 60% pour une journée. La probabilité journalière de survie au sein de la population est plus de 60%.



- **An. funestus**

Le tableau suivant présente le taux de parité et le taux quotidien de survie ou longévité.

Tableau 21: Taux de parité et longévité d'An. funestus

| Site | | Beforona | Marozevo | Soa |
|------------------------------|-----------|----------|----------|-------|
| Taux de parité (%) | Intérieur | 50 | 40,74 | 60 |
| | Extérieur | 54,55 | 20 | - |
| Taux de parité moyen (%) | | 52,28 | 30,37 | 60 |
| Taux quotidien de survie (%) | | 77,13 | 61,18 | 81,52 |

A Beforona, le taux de parité d'An. funestus à l'intérieur et à l'extérieur sont respectivement de 50% et de 54,55%. Cette différence est significative ($X^2 = 20,89$, $p = 0,001$). Le taux de parité à l'extérieur est plus élevé qu'à l'intérieur de l'habitation humaine. Le taux de parité moyen est de 52,28%. Pour 2,5 jours de cycle gonotrophique, le taux quotidien de survie est très élevé à Soa (81,52%) suivi par Beforona (77,13%) et Marozevo (61,18%).

A Marozevo, pour la faune endophage, le taux de parité des moustiques capturés à l'intérieur de la maison (40,74%) est beaucoup plus élevé qu'à l'extérieur 20%. Cette différence est significative ($X^2 = 51,91$, $p \leq 0,001$). Le taux de parité de la faune endophage est différent de la faune exophage. Le taux de parité moyen est 30,37%, on en déduit le taux quotidien de survie qui est de 61,18% pour un cycle gonotrophique de 2,5 jours.

A Soa, le taux de parité est de 60%. Pour 2,5 jours de cycle gonotrophique, le taux quotidien de survie est de 81,52%.

Le taux quotidien de survie est toujours variable d'un site à un autre, 60% à 70% à Beforona et à Marozevo, mais plus élevé à Soa.



d. Rythme d'agressivité nocturne

- ***An. gambiae s.l.*** (Figure 19, tableau 1, 3 et 5 en annexe)

A Beforona, *An. gambiae s.l.* pique beaucoup plus à l'extérieur qu'à l'intérieur de l'habitation humaine surtout durant la deuxième partie de la nuit. Deux pics ont été observés au cours des captures nocturnes en dehors du foyer humain, le premier entre 00-01 heures (3,21 PHN) et le deuxième vers 04-05 heures (4,58) du matin. A l'intérieur des maisons, seul un pic est observé vers 02-03 heures du matin mais ne dépasse pas le taux d'agressivité de 0,83 PHN (figure 19a).

A Marozevo, à l'extérieur, trois pics sont remarqués sur la courbe, l'un dans la première moitié de la nuit entre 20-21 heures (1,60 PHN), les deux autres au milieu de la nuit entre 00-01 heures (1,73 PHN) et le dernier entre 03-04 heures du matin (4 PHN). A l'intérieur, on observe une courbe légèrement ascendante avec un pic entre 04-05 heures (2,52 PHN) au cours des nuits de captures (figure 19b).

A Soa, deux pics ont été observés : durant la première partie de la nuit entre 19-20 heures (3,50 PHN) et un deuxième presque au petit matin entre 04-05 heures (8,50 PHN) à l'extérieur (figure 19c). A l'intérieur, le rythme d'agressivité ne présente pas trop de variation et tourne autour 1,90 PHN.

Pour les trois sites étudiés le pic d'agressivité le plus élevé d'*An. gambiae s.l.* se situe entre 04-05 heures du matin (à l'aube ou à la levée du soleil) aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur. A cette heure, les villageois sont encore au lit et risquent d'attraper le paludisme par les piqûres des anophèles infestés endophages.

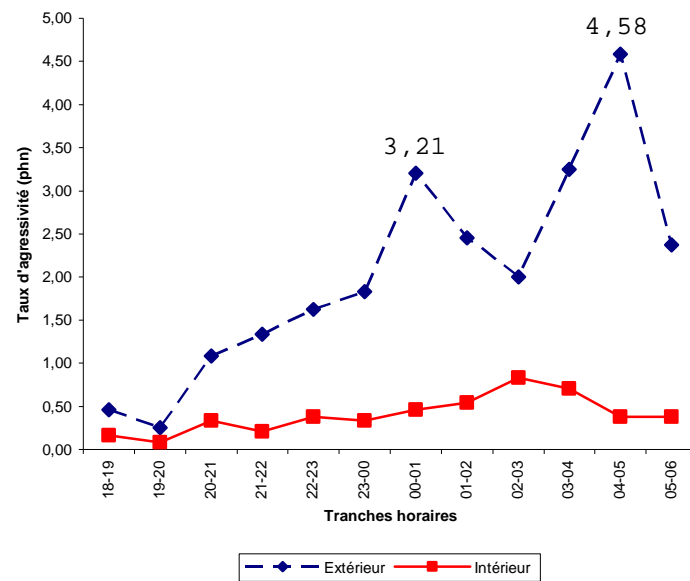


Figure 19a - Beforona

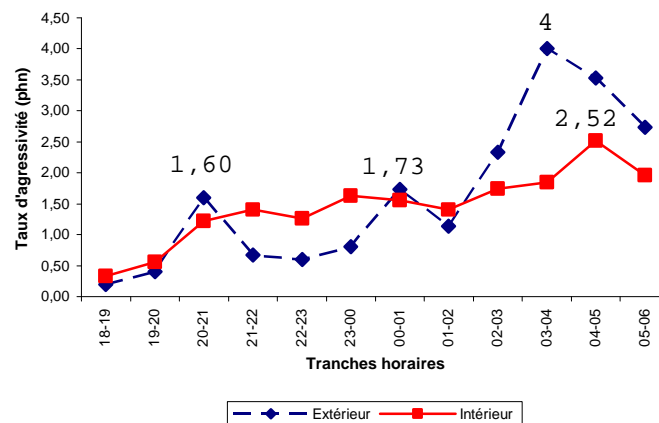


Figure 19b - Marozevo

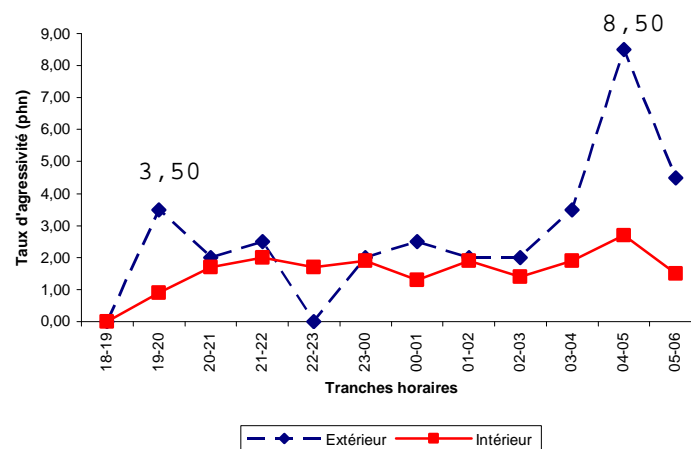


Figure 19c - Soa

Figure 19 : Rythme d'agressivité nocturne d'*An. gambiae s.l.* dans les trois sites d'études (tableau 1, 3 et 5 en annexe III)



- **An. funestus** (Figure 20, tableau 2, 4 et 6 en annexe IIII)

A Beforona, deux pics ont été signalés, le premier au milieu de la nuit entre 23-00 heures (1 PHN) et l'autre vers 03-04 heures du matin (0,63 PHN) à l'extérieur de l'habitation humaine. A l'intérieur, deux pics sont visibles sur la courbe entre 19-20 heures (0,17 PHN) et 21-22 heures (0,21 PHN) (figure 20a).

A Marozevo, trois pics sont montrés sur la courbe de la figure entre 22-23 et 00-01 heures avec un taux d'agressivité de 0,07 PHN durant les deux tranches horaires ; et vers 03-04 heures du matin (0,13 PHN). A l'intérieur de la maison, deux pics sont observés avec un taux d'agressivité à 0,15 PHN entre 22-23 heures et 0,19 PHN vers 04-05 heures du matin (figure 20b).

A Soa, l'homme reçoit 0,50 PHN à l'intérieur de leur habitation vers 01-02 heures du matin et aucune agressivité n'est signalée à l'extérieur de la maison de capture (figure 20c).

Les pics d'activité à l'intérieur sont variables suivant les sites. Mais ces pics ont lieu en plein sommeil. En plus, ce vecteur est endophage à Marozevo. Ceci favorise la transmission du paludisme dans les cases.

La remarque citée au paragraphe IV.6.1.(1) ci-dessus est encore prise en compte.

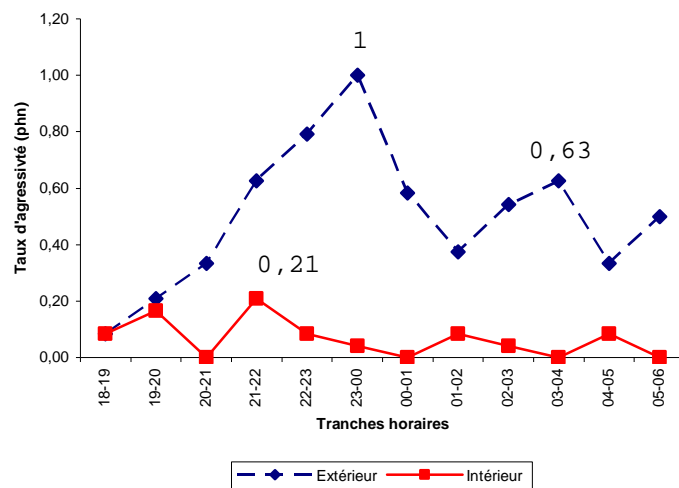


Figure 20a - Beforona

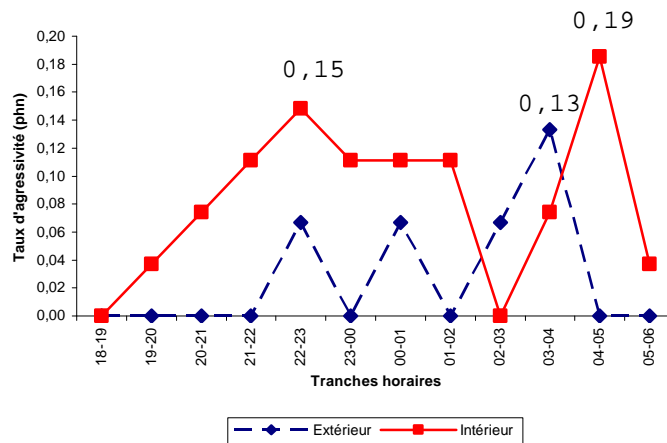


Figure 20b - Marozevo

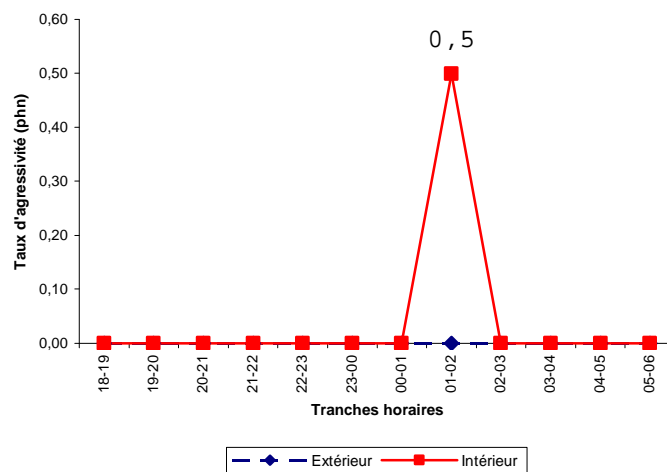


Figure 20c - Soa

Figure 20 : Rythme d'agressivité nocturne d'*An. funestus* dans la zone



IV.6.2. Moustiques capturés en faune résiduelle et effet des insecticides (Tableau 23)

210 chambres réparties dans les trois sites d'études ont été visitées au cours des 6 mois d'enquêtes :

- à Beforona, 120 chambres ont été visitées. Au total, 688 moustiques femelles ont été récoltés. Parmi ces moustiques, 575 appartiennent au genre *Anopheles* (soit 83,57% des anophèles capturés) dont 549 anophèles vecteurs potentiels (soit 95,48% des captures).
- à Marozevo, 78 chambres ont été visitées. Au total, 432 moustiques femelles ont été capturés : 263 sont des anophèles parmi lesquels 256 (97,34%) sont des vecteurs potentiels du paludisme.
- à Soa, sur les 12 chambres visitées dans lesquelles 51 moustiques ont été récoltés. Parmi ces 51 moustiques, 41 sont vecteurs potentiels du paludisme (soit 95,35% des captures). Aucun *An. funestus* n'a été capturé.

Tableau 23 : Répartition des moustiques capturés au repos à l'intérieur des habitations humaines

| | | Beforona | | Marozevo | | Soa | |
|--------------|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| Sous-Famille | Espèces | Eff | % | Eff | % | Eff | % |
| ANOPHELINAE | <i>An. Coustani</i> | 26 | 3,78 | 6 | 1,39 | 2 | 3,92 |
| | <i>An. Squamosus</i> | | | 1 | 0,23 | | |
| | <i>An. Funestus</i> | 30 | 4,36 | 10 | 2,31 | | |
| | <i>An. gambiae s.l.</i> | 414 | 60,17 | 151 | 34,95 | 13 | 25,49 |
| | <i>An. mascarensis</i> | 105 | 15,26 | 95 | 21,99 | 28 | 54,90 |
| CULICINAE | <i>Cx. antennatus</i> | 35 | 5,09 | 66 | 15,28 | 1 | 1,96 |
| | <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 11 | 1,60 | 52 | 12,04 | 5 | 9,80 |
| | <i>Mansonia uniformis</i> | 67 | 9,74 | 51 | 11,81 | 2 | 3,92 |
| Total | | 688 | 100 | 432 | 100 | 51 | 100 |



- ***An. gambiae s.l.***

La densité par case (DPC) a été calculée afin d'évaluer les anophèles femelles vecteurs qui se reposent dans chaque chambre à coucher jusqu'au petit matin et afin d'établir la courbe d'évolution mensuelle de cette densité durant l'étude sur le terrain divisée en 2 périodes, la première sans traitement insecticide et la deuxième avec épandage.

Le tableau 24 suivant montre la moyenne par case ou densité par case d'*An. gambiae s.l.* capturée au repos et la figure 21 l'évolution de cette densité au cours des captures matinales.

Tableau 24: Densité par case mensuelle d'*An. gambiae s.l.*

| Sites | avr-03 | mai-03 | sept-03 | avr-04 | mai-04 | juin-04 |
|----------|------------------|--------|---------|------------------|--------|---------|
| Beforona | 1,3 | 2,95 | 1,2 | 8,05 | 3,35 | 0,55 |
| Marozevo | 3 | 6,67 | 5 | 1,83 | 0,67 | 0,17 |
| Soa | 3 | 2,25 | 0,75 | 1 | 1,75 | 0,5 |
| | Avant l'épandage | | | Après l'épandage | | |

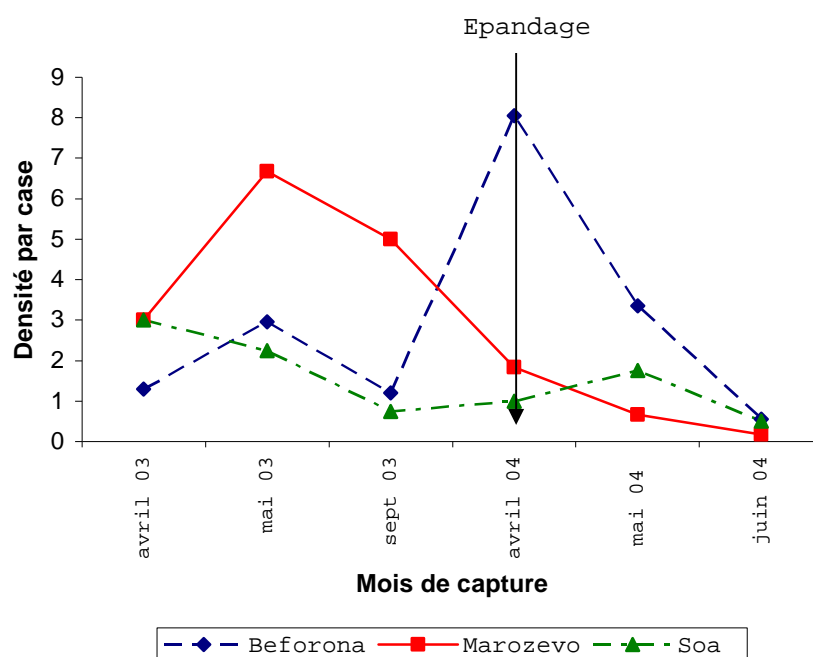


Figure 21: Evolution d'*An. gambiae s.l.* en faune résiduelle au cours des mois de capture



A Beforona (site témoin où aucun traitement n'a été fait), la densité moyenne est de 2,90 par case. En observant la courbe (figure 21), deux pics sont enregistrés : un pic au mois de mai 2003 (2,95) et un grand pic au mois d'avril 2004 (8,05). Ensuite, la courbe descend jusqu'à 0,55 DPC au mois de juin 2004.

A Marozevo, (site traité par PKT au mois d'avril), les DPC moyennes sont de 4,89 avant traitement et de 0,89 après traitement. La DPC moyenne diminue de 5,5 fois après le traitement.

En comparant les DPC :

- au site témoin à Beforona, ces DPC sont respectivement de 1,3 et de 2,95 en avril et mai 2003. Un an plus tard, ces DPC ont augmenté de 4 fois (avril 2004) et connu une légère hausse de 3,35 (mai 2004) contre 2,95 (mai 2003) ;
- à Marozevo, avant traitement, les DPC sont respectivement de 3 et de 6,67 en avril et mai 2003. Un an après, ces DPC ont diminué de 1,6 fois en avril 2004 et presque 10 fois en mai 2004. Une diminution des DPC est observée.
- Si nous nous référons au site témoin au cours de l'année 2004, la DPC aurait dû augmenter par rapport à 2003. Mais au contraire une diminution est constatée. Un effet de l'extrait de PKT pourrait expliquer la diminution de la DPC dans le site traité en tenant compte des valeurs de la DPC dans le site témoin.

Les valeurs calculées $T_{\text{calculé}}$ sont inférieures à la valeur critique T_{table} ($4,13 < 4,60$) pour les DPC de *An. gambiae s.l.*, l'hypothèse principale H_0 d'égalité des densités par case est rejetée au seuil de signification de 1% ($\alpha=0,01$) (tableau 25).

Les DPC à Marozevo avant et après épandage présentent une différence significative c'est à dire la DPC avant épandage est plus grande que la DPC après épandage. Cette différence pourrait être due à l'effet de l'insecticide (la fraction



aqueuse de l'extrait de plante codée PKT) pulvérisé sur le mur à l'intérieur de l'habitation humaine car les moustiques qui se sont reposés sur le mur ont été répulsés ou tués par l'insecticide.

Tableau 25: Densité par case d'*An. gambiae s.l.* à Marozevo avant et après épandage

| | Epandage | | | |
|--|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|
| Période | Avant | | Après | |
| Echantillon | X ₁ | (X ₁) ² | X ₂ | (X ₂) ² |
| 1 | 3,00 | 9,00 | 1,83 | 3,35 |
| 2 | 6,67 | 44,49 | 0,67 | 0,45 |
| 3 | 5,00 | 25,00 | 0,17 | 0,03 |
| Somme | 14,67 | 78,49 | 2,67 | 3,83 |
| SCE | 6,75 | | 1,45 | |
| T calculé | 4,13 | | | |
| T table | 4,60 | α=0,01 | | |
| ddl | 4 | | | |
| T _{calculé} < T _{table} (0,01) | | | | |

A Soa, en avril et mai 2003, période sans traitement, les DPC sont respectivement de 3 et de 2,25. Un an après, après le traitement, elles sont de 1 (avril 2004) et de 1,75 (mai 2004). Les DPC après épandage ont diminué de moitié (tableau 26).

Dans le site témoin, pendant les mêmes périodes, les variations des valeurs de DPC ont augmenté en 2004 par rapport à 2003. Normalement si aucun épandage n'a été fait, l'évolution des DPC aurait dû suivre cette augmentation à Marozevo. Mais une diminution de DPC est observée après l'épandage dans ce site traité. Elle pourrait être due à l'effet du traitement à l'extrait de RDO II

Les valeurs calculées $T_{\text{calculé}}$ sont inférieures aux valeurs critiques $T_{\text{table}} (0,56 < 4,60)$ pour les DPC de *An. gambiae s.l.*,



l'hypothèse principale H_0 d'égalité des moyennes de moustique par habitation est rejetée au seuil de signification de 1 % ($\alpha=0,01$) (tableau 26).

Les densités par case à Soa avant et après épandage présentent une différence significative. La DPC avant l'épandage est supérieure à celle après l'épandage. Cette différence pourrait être due à l'effet de l'insecticide (extrait hexanique de la plante codée RDO II) pulvérisé sur le mur à l'intérieur de l'habitation humaine car les moustiques qui se sont reposés sur le mur ont été soit répulsés soit tués par l'insecticide.

Tableau 26 :Densité par case d'*An. gambiae s.l.* à Soa avant et après l'épandage

| | Epandage | | | |
|--|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|
| Période | Avant | | Après | |
| Echantillon | X ₁ | (X ₁) ² | X ₂ | (X ₂) ² |
| 1 | 3,00 | 9,00 | 1,00 | 1,00 |
| 2 | 2,25 | 5,06 | 1,75 | 3,06 |
| 3 | 0,75 | 0,56 | 0,50 | 0,25 |
| Σx | 6,00 | 14,63 | 3,25 | 4,31 |
| SCE | 2,63 | | 0,79 | |
| T | 0,56 | | | |
| T table | 4,60 | α=0,01 | | |
| ddl | 4 | | | |
| T _{calculé} < T _{table (0,01)} | | | | |



• **An. funestus** (Tableau 27)

La moyenne par habitation ou densité par case d'*An. funestus* est donnée par le tableau 25 suivant.

Tableau 27 : Densité par case mensuelle d'*An. funestus*

| Sites | avr-03 | mai-03 | sept-03 | avr-04 | mai-04 | Juin-04 |
|----------|------------------|--------|---------|------------------|--------|---------|
| Beforona | 0,25 | 0,6 | 0,05 | 0,3 | 0,15 | 0,15 |
| Marozevo | 0,17 | 0,83 | 0,17 | 0 | 0 | 0,17 |
| Soa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Avant l'épandage | | | Après l'épandage | | |

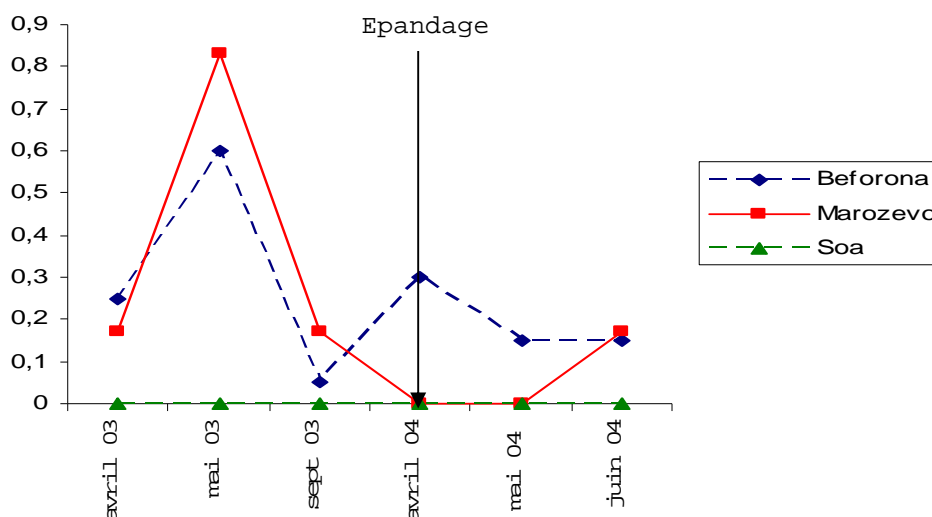


Figure 22 : Evolution d'*An. funestus* en faune résiduelle au cours des mois de capture

A Beforona (site témoin), la DPC moyenne durant l'étude est de 0,25. Sur la courbe de la figure 22, un pic de 0,6 est enregistré au mois de mai 2003. Les densités moyennes en avril et mai 2003 sont de 0,25 et 0,6. Elles diminuent respectivement à 0,3 et 0,15 en avril et mai 2004 suite aux facteurs naturels

A Marozevo (traité par PKT), avant le traitement, la DPC moyenne est de 0,39. Après le traitement, elle est de 0,06. Cette DPC est réduite de 6 après l'épandage. En avril et mai 2003, la moyenne de la DPC est de 0,5 et elle est réduite à 0 aux mois d'avril et mai 2004.



Cette diminution dans ce site traité pourrait être affectée à l'action toxique de l'insecticide.

La valeur calculée $T_{\text{calculé}}$ est inférieure à la valeur critique T_{table} ($4,13 < 4,60$) des DPC de *An. funestus*, l'hypothèse principale H_0 d'égalité des densités par case est rejetée au seuil de signification de 1% ($\alpha=0,01$) (tableau 28).

Les densités par case à Marozevo avant et après épandage présentent une différence significative. Elle est moins élevée après l'épandage. Cette différence pourrait être due à l'effet de l'insecticide (la fraction aqueuse de l'extrait de plante codée PKT) pulvérisé sur le mur à l'intérieur de l'habitation humaine car les moustiques qui se sont reposés sur le mur ont été répulsés ou tués par l'insecticide.

Tableau 28 : Densité par case d'*An. funestus* à Marozevo avant et après épandage

| | Epandage | | | |
|--|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|
| Période | Avant | | Après | |
| Echantillon | X ₁ | (X ₁) ² | X ₂ | (X ₂) ² |
| 1 | 0,17 | 0,03 | 0,00 | 0,00 |
| 2 | 0,83 | 0,69 | 0,00 | 0,00 |
| 3 | 0,17 | 0,03 | 0,17 | 0,03 |
| Somme | 1,17 | 0,75 | 0,17 | 0,03 |
| SCE | 0,29 | | 0,02 | |
| T | 0,14 | | | |
| T table | 4,60 | α=0,01 | | |
| ddl | 4 | | | |
| T _{calculé} < T _{table} (0,01) | | | | |

La valeur calculée $T_{\text{calculé}}$ est inférieure à la valeur critique T_{table} ($0,08 < 4,60$) des DPC de *An. funestus*, l'hypothèse principale H_0 d'égalité des moyennes de moustique par habitation est rejetée au seuil de signification de 1% ($\alpha=0,01$).



La densité par case à Soa avant et après épandage présente une différence significative. Elle est plus ou moins élevée après l'épandage. Cette différence pourrait être due à l'effet de l'insecticide (extrait hexanique de la plante codée RDO II) pulvérisé sur le mur à l'intérieur de l'habitation humaine car les moustiques qui se sont reposés sur le mur ont été soit répulsés soit tués par l'insecticide.

D'après ces analyses, les deux insecticides végétaux PKT et RDO II testés ont présenté des effets sur les anophèles vecteurs dans les cases traitées par la diminution de leur densité par case.



V. DISCUSSIONS

V.1. Recherche bibliographique et liste des plantes à vertus insecticides

Les 16 plantes relevées par les enquêtes bibliographiques sont peu nombreuses. En comparant le résultat de nos enquêtes bibliographiques par rapport à celui du projet Voarisoa (25) qui révèle 450 espèces de plantes pesticides, ces 16 plantes ne représentent que 3,56 % de cette liste dressée par ce projet.

Toutes les plantes de la liste de ce projet peuvent être toxiques ou utilisées pour lutter contre les insectes nuisibles de la culture mais leur capacité toxique sur les imagos des moustiques vecteurs de maladie reste à vérifier.

V.2. Collecte des plantes

Huit plantes sont collectées d'après les descriptions dans les ouvrages consultés et/ou les recommandations des populations locales de chaque région de collecte.

Six des huit plantes collectées sont tous endémiques de Madagascar. Deux ne le sont pas.

V.3. Extraction chimique

Le rendement obtenu après une extraction alcoolique est variable suivant l'espèce de plante. La cause de cette variation peut s'expliquer par la solubilité des substances actives contenues dans chaque plante. L'extraction à l'éthanol est employée car c'est le solvant qui peut puiser les matières actives et le moins cher du marché. Ici, l'alcool est recommandé car il s'évapore entre 50° à 60°C au lieu de l'eau distillée qui ne s'évapore qu'à plus de 60°C. Au delà de 60°C, les principes actifs risquent d'être dénaturés.

Comme la fraction aqueuse est le produit de la lyophilisation du broyat de plante macéré dans l'eau, les principes actifs de la plante codée PKT (lyophilisat) sont complètement solubles dans l'eau.



La fraction hexanique de RDO II est obtenue par l'extraction par l'appareil de Soxhlet dont le solvant utilisé est l'hexane. Les substances actives sont solubles dans l'hexane. Malgré le rôle de dépigmentation de l'hexane, le rendement obtenu est faible (1,16% pour RDO II) par rapport à celui de la lyophilisation (11,21% pour PKT).

En comparant le rendement obtenu de l'extraction à l'éthanol par ces deux dernières méthodes d'extraction, celle de la fraction aqueuse semble la plus efficace, suivie par l'extraction alcoolique et enfin l'extraction hexanique. Le rendement de l'extraction de RDO II obtenu par l'appareil de Soxhlet est de 1,16% alors que par partage liquide/liquide faite par Rabeniala en 2002 le rendement obtenu est de 7,46%. Cette différence est due à la caractéristique de chaque extraction.

V.4. Collecte et élevage des moustiques

Seule la génération F1 a été obtenue au cours de l'élevage. Plusieurs facteurs peuvent être la cause de cette non obtention d'autres générations que F1 :

- la température de l'insectarium : la baisse de la température malgré l'effort de garder la température à plus de 27°C. La coupure de courant électrique est l'un des problèmes fréquemment rencontrés soit dû au fusible endommagé par surtension ou une sous-tension, soit dû à la coupure de la résistance chauffante. L'arrivée du ruban chauffant a résolu ce dernier problème ;
- la photopériode ; l'activité nycthémerale des moustiques en insectarium semble être perturbée par la coupure du courant également. Un minuteur programmable semble nécessaire pour régler ce problème pour obtenir plus de génération que celle de F1.
- repas de sang: *An. arabiensis* est une espèce zoophile, la souris et quelque fois l'homme sont les appâts utilisés pour gorger ces moustiques. L'appât humain semble efficace mais



faute de volontaire, cette méthode n'a été utilisée que quelques fois durant l'élevage.

- alimentation des larves : l'utilisation ponctuelle des nourritures riches en protéines et en substances comme le « Tetra Baby Fish Food® » permet d'avoir une bonne survie des larves par rapport à l'utilisation des « Feed Mill® » broyés et tamisés. L'ajout de quelques gouttes de vitamines dans l'eau d'élevage apporte aux larves de moustiques des nutriments complémentaires qui ne sont pas disponibles dans l'eau d'élevage mais présentes dans le milieu naturel.

Au cours de l'élevage, l'hygrométrie a été maintenue stable (70 à 80 %).

Malgré ces problèmes rencontrés pendant l'élevage, le rendement est de 63,03% et nous permet de faire plusieurs séries de tests de toxicité sur les adultes d'*An. arabiensis*. Le nombre de moustique obtenu en F1 au cours de l'élevage est suffisant pour le bon déroulement du test. Par contre, Diop *et al.* en 1998 a trouvé 93,9% de rendement en F1 lors de l'élevage d'*An. arabiensis* en insectarium. Cette équipe a montré également dans sa publication la réussite de son élevage : obtention d'autres générations que celle de F1 avec un rendement de 90,6 % en F2 et 92,9 % en F3.

La durée du cycle de développement est de 7 à 15 jours suivant la variation de la température.

Pour une bonne marche de l'élevage, il faut bien imiter toutes les conditions écologiques dans leur milieu naturel afin de satisfaire les besoins de l'espèce d'*An. arabiensis* en insectarium.

V.5. Test de sensibilité des moustiques aux extraits de plantes

- les produits de référence OMS présentent un taux de mortalité à 100% chacun. Ceci montre que les moustiques élevés en insectarium (*An. arabiensis*) n'ont pas de gène résistant vis-à-vis de ces insecticides. Sur les Hautes Terres Centrales, le DDT est le seul insecticide employé durant la campagne OPID ou Opération de Pulvérisation Intra-domiciliaire



de DDT qui a débuté à large échelle en 1993 jusqu'en 1998 sur l'ensemble des terres situées entre 1000 et 1500 mètres d'altitude à raison d'un cycle tous les ans soit cinq cycles d'aspersions. Depuis 1999, l'OPID est remplacée par le CAID ou Campagne d'Aspersion Intra-domiciliaire de DDT pour éviter l'apparition de nouvelle épidémie du paludisme sur les Hautes Terres Centrales Malagasy.

An. gambiae s.l. a été testés aux pyréthrinoïdes à Alasora, Rakotondraibe et al. en 2000 ont montré que ces tests de sensibilité effectués par IPM et le Service de Lutte Contre le Paludisme (SLP) ont donné une mortalité de 100% sauf pour la perméthrine (87,2%)

- les extraits éthanoliques, hexaniques, chloroformiques et aqueuses des plantes codées ST 667, ST 668, ST 670 et MNKR ne présentent aucune activité sur les adultes d'*An. arabiensis*.

Donc, les fractions de chaque plante ne contiennent aucune substance active toxique pour les imagos d'*An. arabiensis*. Par contre, les substances actives de la plante RDO II et PKT se trouvent respectivement dans la phase hexanique et aqueuse. En 2002, Rabeniala a effectué des tests de sensibilité sur *An. arabiensis* sur chaque fraction de l'extrait de RDO II. Seule la fraction hexanique de RDO II a donné un résultat. Au cours de la présente étude, l'équipe du sous-projet F@des SP02v2_05 a revérifié l'efficacité de cette dernière fraction tant au laboratoire que sur le terrain. Les résultats obtenus au laboratoire montrant une CL50 applicable pour un épandage intra-domiciliaire sont vérifiés lors des essais de pulvérisation intradomiciliaire à Marozevo et à Soa.

V.6. Travaux sur le terrain à Beforona, à Marozevo et à Soa

De nombreuses espèces de Culicidae ont été collectées. Les moustiques des genres *Culex* et *Mansonia*, bien que moins abondants que les anophèles, sont présentes pendant toute la période d'étude et sont considérés comme source de nuisance pour la population (Ravoahangimalala et al., 2003). Ces auteurs ont montré dans le même article qu'à Ambohimahavelona



et à Kalandy, beaucoup d'individus de ces genres (537 *Culex* et 204 *Mansonia*) ont été récoltés.

V.6.1. Capture de nuit sur appât humain

(1) Espèces culicidiennes agressives pour l'homme

Dans les trois sites étudiés de la Commune rurale de Beforona, la faune agressive pour l'homme est dominée par le genre *Anopheles*. *An. gambiae s.l.* est la plus représentée suivi par *An. mascarensis* et par *An. funestus*.

An. gambiae s.l. est le vecteur principal dans le site d'étude. En effet cette espèce est la plus dominante et la plus représentée dans cette zone d'étude au cours de chaque capture. *An. funestus* reste le vecteur secondaire de la région. Du point de vue effectif, *An. funestus* reste faible du début jusqu'à la fin des interventions sur le terrain.

Au cours de ce travail, on n'a pas pu déterminer les membres du complexe *An. gambiae*, mais des études antérieures nous informent que le vecteur principal collecté et identifié à Beforona est dominé par *An. gambiae s.s.* (Ralisoa, 1996 et Leong Pock Tsy et al., 2003) et la présence d'*An. arabiensis* est moindre.

En ce qui concerne, *An. mascarensis*, jusqu'ici on ne peut pas dire et confirmer l'importance de cette espèce dans la transmission du paludisme faute de vérification (test ELISA).

(2) Ethologie des vecteurs

a. Evaluation du PHN et endophagie

• *An.gambiae s.l.*

Dans les trois sites, le nombre de piqure par homme par nuit est variable d'un site à un autre. Ceci peut être dû aux habitudes journalières des villageois.

Chauvet et al. (1969) a stipulé que sur la côte Ouest et le versant Ouest de Madagascar, le taux d'endophagie est inférieur à 50% (respectivement de 41% et 43%) qui est identique à nos résultats à Beforona et Soa sur la côte



orientale montrant que *An. gambiae s.l.* a une tendance à l'exophagie. A Marozevo, ce taux tourne autour de 47%, la tendance est plutôt endo-exophage.

- ***An. funestus***

C'est le vecteur secondaire de la région de Beforona, Marozevo et Soa.

Le taux d'agressivité moyen d'*An. funestus* à l'intérieur de l'habitation humaine est faible par rapport celui à l'extérieur, valable pour les trois sites étudiés. Le taux d'agressivité est faible par rapport à *An. gambiae s.l.*

Cette espèce est endophage à Marozevo et à Soa (avril 2004). Fontenille et al. (1989) a déjà mentionné que sur les Hauts Plateaux de Madagascar, *An. funestus* est endophage. En 1966, Grejbine a signalé que cette espèce est la plus endophage de tous les Anophèles. Par contre, elle reste exophage à Beforona.

b. Rythme d'agressivité nocturne

L'activité nocturne des anophèles est fonction de leur biologie et des mœurs de la population hôte de chaque région. En effet, les pics d'agressivité correspondent à la période où le moustique a le plus de chance d'être en contact avec son hôte. Il ne faut pas non plus négliger le facteur attractif : dégagements de CO₂.

- ***An.gambiae s.l.***

Fontenille et al. en 1989 ont observé que sur les Hauts Plateaux malagasy, le complexe *An. gambiae s.l.* est plus actif au cours de la première moitié de la nuit. En zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest, Brengues et al. (1969) ont signalé aussi le même fait. Dans nos résultats, *An. gambiae s.l.* est agressive pendant toute la nuit mais le pic maximal



dans les zones d'étude est observé durant la deuxième partie de la nuit, vers 04-05 heures du matin. Ceci n'empêche pas cette espèce de piquer au cours de la première moitié de la nuit mais le taux d'agressivité reste inférieur à ce pic maximal. Elle pique aussi beaucoup plus à l'extérieur qu'à l'intérieur.

- ***An. funestus***

L'activité nocturne de cette espèce est variable d'une région à une autre. A Beforona et à Marozevo, elle est plus agressive surtout durant la première moitié de la nuit. Grejbine en 1966 a déjà montré que cette espèce commence à piquer à la tombée de la nuit.

Ces heures de piqûres correspondent à la période où les gens sont encore au lit. L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides est vivement souhaitée dans ces zones d'étude.

V.6.2. Moustiques capturés en faune résiduelle

Au repos, le genre *Anopheles* est encore plus abondant que les autres genres de la Sous-Famille des Culicinae.

Les espèces vectrices capturées sont aussi dominées par *An. gambiae s.l.* en faune résiduelle. Pour ce dernier, la densité par case est 0,53-8,05 à Beforona; 0,17-6,67 à Marozevo et de 0,5-2,25 à Soa.

L'abondance d'*An. gambiae s.l.* tant sur la faune agressive que sur la faune résiduelle s'explique par l'abondance de la pluie qui tombe presque toute l'année. Les rizières sont donc toujours humides durant toute l'année. En effet, ces types de gîtes sont favorables au développement larvaire de cette espèce.

Concernant l'abondance des vecteurs dans les sites d'études : Beforona, Marozevo et Soa, la distance des gîtes larvaires par rapport au village joue un rôle sur cette abondance. Pour ces trois villages, les rizières qui sont aux



alentours de 50 à 1500 mètres ou plus, constituent des gîtes larvaires favorisant leur prolifération. Les poulaillers et les porcheries sont près des habitations humaines et les volailles et les porcs sont une source de sang pour les moustiques femelles.

- ***An. gambiae s.l.***

Les densités moyennes d'*An. gambiae s.l.* au repos dans les chambres à coucher sont de 2,90 femelles d'*An. gambiae s.l.* par pièce durant nos études sur le terrain à Beforona et à Marozevo. Cette densité par case est plus faible à Soa (1,08 femelle par pièce)

- ***An. funestus***

La densité par case d'*An. funestus* femelles au repos capturée à l'intérieur de l'habitation est faible par rapport à celui de d'*An. gambiae s.l.* Peu d'individu a été collecté au cours de chaque capture matinale. Cette espèce fait sa digestion à l'extérieur de la maison d'habitation. En 1947, B. Wilson a montré une densité par case de 0,04 d'*An. funestus* à Ambatolampy et Ambohimahasoa; 1,5 à Ambositra. Ces trois régions font parties des Hauts Plateaux Centraux de Madagascar. Ces résultats sont identiques à ceux observés à Beforona (0,05-0,6), à Marozevo (0,17-0,83) et à Soa (0,25)] effectués dans la partie orientale de Madagascar.

V.7. Impact des insecticides sur les moustiques vecteurs

L'étude des effets est effectuée sur l'observation que la plupart des anophèles vecteurs qui entrent dans les habitations pour piquer et vont ensuite se poser sur les parois intérieures des murs. Les pulvérisations couvrent toutes les surfaces intérieures. Nos résultats ont montré que les espèces vectrices *An. gambiae s.l.* et *An. funestus* sont sensibles aux deux extraits de plantes (PKT et RDO II) et leur effet entraîne une diminution de la DPC. Deux cas peuvent se



présenter : soit les moustiques sont tués au contact direct avec la fraction active de l'insecticide, soit ils sont répulsés par la matière active de l'extrait. L'essentiel est que le contact homme-vecteur soit arrêté.

V.7.1. Impact des deux extraits de plantes codées respectivement PKT et RDO II au laboratoire et sur le terrain.

Les résultats obtenus au laboratoire sont vérifiés sur le terrain sur les anophèles au repos c'est-à-dire qui fait sa digestion à l'intérieur de l'habitation humaine. Les matières actives de chaque extrait de plante n'agissent qu'au contact direct avec les moustiques qui viennent se poser au mur.

Il est aussi important de noter que pour réduire le contact homme-vecteur, il faut que les insectes vecteurs de maladies soient tués par l'effet d'un produit insecticide que ce soit biologique ou de synthèse, pour ne pas infester les autres à son tour après une piqure infestante pour éviter toutes formes d'épidémies.

D'après les enquêtes parasitologiques et le suivi de la santé sur la population des sites témoins et traités par PKT et RDO II faits par un médecin (Ratefinjanahary, 2004), les indices plasmodiques sont de 16,28% avant l'épandage (septembre 2003) et 13,04% durant l'épandage (avril 2004). Ces indices plasmodiques diminuent de moitié un mois après le traitement (6,52%) et à 2,70% deux mois après (Rapport F@des). Ces résultats confirment l'existence de toxicité de ces extraits (PKT et RDO II) sur les vecteurs de paludisme et cette activité se répercute sur l'indice plasmodique des paludéens suivi dans les sites étudiés.

V.7.2. Insecticide de synthèse recommandé par l'OMS (1999)

A Madagascar le DDT est le seul insecticide de synthèse à effet rémanent utilisé pour lutter contre les insectes vecteurs de maladies à risque épidémique et meurtrière. La



dose est de 1 à 2 g/m² soit 0,1 à 0,2 mg/cm² après conversion, la durée d'efficacité est de 6 mois ou même davantage, l'action de l'insecticide est par contact direct et en terme de pollution, de toxicité et d'empoisonnement, le DDT est classé parmi les insecticides à danger modéré pour l'environnement et pour la santé humaine. Son utilisation est formellement interdite dans tout le territoire malgache. Les concentrations létales obtenues au laboratoire pour chaque extrait (PKT = 3,49mg/cm² et RDO II = 0,19mg/cm²) sont supérieures à celle recommandée par l'OMS pour le DDT. A cet effet, une étude approfondie de chaque extrait devrait être entreprise jusqu'à l'obtention et la détermination de la molécule active.



CONCLUSION

Au terme de cette étude, les différentes activités sont faites suivant les objectifs émis.

La liste des plantes à effets insecticides recensée est peu nombreuse et le délai de recensement devrait être long pour avoir une liste exhaustive maximale.

Le rendement de l'extraction est suffisant pour le test au laboratoire, mais une fois le test positif, l'extraction devrait être faite à grande échelle avec des matériels adéquats.

L'élevage qui a été développé au LBPP a montré un rendement moyen. Seule la génération F1 est obtenue. Pour avoir plus de génération que F1, toutes les conditions écologiques naturelles devrait être respectées et bien étudiées point par point.

Les moustiques adultes d'*An. arabiensis* qui ont subi le test de sensibilité ne présentent pas une résistance vis-à-vis des insecticides de synthèse comme le Fenitrothion, Malathion et DDT (test de sensibilité effectué au laboratoire, OMS en 1970 et 2003). Le test de sensibilité effectué au LBPP a montré que la fraction aqueuse de la plante PKT et l'extrait hexanique de la plante RDO II sont toxiques pour les imagos d'*An. arabiensis*.

L'étude de l'efficacité sur le terrain a été effectuée dans la Commune Rurale de Beforona dans le Fivondronana de Moramanga. La pulvérisation intra-domiciliaire dans les chambres à coucher des deux extraits de plantes (fraction aqueuse de PKT et extrait hexanique de RDO II) a entraîné une diminution de la densité par case d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* capturés en faune résiduelle et de l'indice plasmodique. Les deux extraits de plantes ont des effets toxiques sur les moustiques vecteurs ce qui entraîne la diminution de transmission chez la population cible.



Comme la plante codée PKT est endémique de Madagascar, elle fait partie de la richesse de notre pays en matière floristique.

Au niveau local, elle est facile à utiliser pour lutter contre les insectes ou les parasites ravageurs de cultures, en particulier la patate douce car il suffit de macérer la plante pendant 24 heures avec de l'eau pour puiser la matière active contenue dans la plante après filtration.

Pour améliorer les résultats dans le futur, nous suggérons une étude approfondie au laboratoire (purification des extraits) et sur le terrain de chaque extrait brut de plante :

- extraction par chromatographie sur colonne de la ou des molécule(s) active(s),
- isolement et détermination de la ou des molécule(s) active(s) toxiques pour les moustiques vecteurs du paludisme et/ou de la filariose,
- et étude sur le terrain pour vérifier la toxicité au laboratoire de la ou des molécule(s) active(s).

Les recherches comme le présent rapport sont utiles pour Madagascar et devraient être soutenues financièrement par l'état.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 AMBROISE-THOMAS P., CARNEVAL P., FELIX H., MOUCHET J. 1991, Le paludisme. *Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses*, 27p.
- 2 BLANCHARD-DESCE M. et al. 1987, Chimie organique expérimentale. Paris: Hermann-Collection, Enseignement des Sciences.
- 3 BRENGUES J. et COZ J. 1973, Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae*, Giles (espèce A) et *Anopheles funestus*, Giles, en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. *Ent. Méd. Et Parasitol.*, **11(3)**, 107-126.
- 4 BURKOT T.R., WILLIAMS J.L. et SCHNEIDER I. 1984, Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double Antibody Enzym-Linked Immunosorbent Assay. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **33**, 783-788.
- 5 CHAUVET G et al. 1969, Contribution à l'étude biologique des vecteurs du paludisme à Madagascar. *Méd. Trop.*, **24**, 22-43.
- 6 DETINOVA T.S. 1963, Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale (monographie n° 47). Genève: Organisation Mondiale de la Santé, 220 p.
- 7 DIOP A., Faye O. et MOLEZ J.F. 1998, Mise en place en Insectarium d'une souche d'*Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Entomologie médicale*.



- 8 DONQUE G., 1975, Contribution Géographique à l'étude du climat de Madagascar, *Nouvelle Imprimerie des Arts Graphiques*.
- 9 DUPOUY J. et CAMET. 1995, Classification et mode de transmission des parasites. *Edit. Techn. Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses*, 8p.
- 10 FONTENILLE D. RAKOTOARIVONY I., RAJAONARIVELO E., LEPERS J.P. 1988, Etudes des Culicidae dans le Firaisam-pokontany d'Ambohimanjaka aux environs de Tananarive: résultats d'une enquête longitudinale, en particulier sur la transmission vectorielle du paludisme. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **54(1)**, 231-243.
- 11 FONTENILLE D. 1989, Intérêt de l'utilisation de la technique ELISA dans l'évaluation de la transmission du paludisme à Manarintsoa, Sainte-Marie. *Journée Scientifique de l'Océan Indien Francophone*, 1-8.
- 12 FONTENILLE D. et al. 1990, Les vecteurs du paludisme, leur rôle dans la transmission, à Manarintsoa sur les Hauts Plateaux de Madagascar de 1986 à 1990. *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar*, **57**, 935-968.
- 13 GREJBINE A. 1966, Insectes. Diptères Culicidae Anophelinae. *Faune de Madagascar*. Muséum d'Histoire Naturelle, **fascicule 22**, Paris: ORSTOM.
- 14 LAVENTURE S. et al. 1996, Le riz: source de vie et de mort sur les plateaux de Madagascar. *Cahiers Santé*, **6**, 79-86.



- 15 LÉONG POCK TSY J.M. *et al.* 2003, Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal*, **2**, 7pp.
- 16 MARRAMA L., *et al.* 1995, *Anopheles funestus* et la riziculture sur les plateaux de Madagascar. *Cahiers Santé*, **5** (6), 415-419.
- 17 Ministère de la Santé; Direction de la Recherche, des Etudes et de Planification; Service de la Surveillance Epidémiologique et de la Gestion des Informations Sanitaires, 2002, Annuaire des statistiques du secteur santé de Madagascar.
- 18 MOUCHET J. et BLANCHY S. 1995, Particularités et stratification du paludisme à Madagascar. *IV^{ème} Journées Scientifiques du Réseau Paludisme de l'AUP ELF-UREF*.
- 19 MOUCHET J. et BLANCHY S. 1995, Diversité et stratification du paludisme à Madagascar. *Cahiers Santé*, **5**, 386-388.
- 20 MOUCHET J. et CARNEVALE P. 1991, Les vecteurs et la transmission. *In* Paludisme, Danis M. et Mouchet J., Paris : Editions Ellipses/AUP ELF, 34-59.
- 21 MOUCHET J. *et al.*, 1993, Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar*, **60** (1-2), 50-69.



- 22 OMS, 2003, Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs. *Guide du Stagiaire*, 104 p.
- 23 OMS, 1991, Matériel de lutte contre les vecteurs, Genève: *Organisation mondiale de la Santé*, 3^{ème} éd.
- 24 OMS, 1970, Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Série des rapports techniques, **443**, 307 p.
- 25 Projet Voarisoa, 1999, Inventaire des pesticides naturels d'origine végétale à Madagascar, Antananarivo, 124p.
- 26 RABARISON P. et al. 1997, Impacts des rideaux imprégnés de deltaméthrine sur les vecteurs et la morbidité palustre: résultats à Ankazobe, sur les plateaux de Madagascar. *Cahiers Santé*, **7(1)**, 3-66.
- 27 RABENIALA R. 2002, Etude de propriétés larvicides et imagocides des extraits des plantes codées RDO I et RDO II sur les moustiques vulnérants. *Département de Biologie Animale, Facultés des Sciences, Université d'Antananarivo*, 84p.
- 28 RAJAONARIVELO V. et al. 2004, Les Anophèles et la transmission du paludisme à Ambohimena, village de la marge Occidentale des Hautes Terres Centrales Malgaches. *Parasite*, **77**, 75-82.



- 29 RAKOTONDRAIBE M.E. et al. 2000, Sensibilité aux insecticides des vecteurs du paludisme sur les Hautes Terres de Madagascar après cinq années de lutte antivectorielle. *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar*, **66** (1 et 2), 32-35.
- 30 RALISOA O.B. 1996, Biogéographie du complexe *Anopheles gambiae* de Madagascar, vecteur du paludisme. In *Biogéographie de Madagascar*, Lourenço W.R., Paris: Editions de l'ORSTOM, 523-534.
- 31 RANAIVOSON N. 2000, Etude d'impact environnemental du DichloroDiphényl-1-Trichlorométhane (DDT) utilisé en aspersion intra-domiciliaire contre les vecteurs du paludisme dans la région d'Ambatolampy. . *Département de Biologie Animale, Facultés des Sciences, Université d'Antananarivo*, 71p.
- 32 RATEFIARISOA R.F., RANDRIANASOLO R.O. et RAJAONARIVELO E. 1988, Sur la faune anophélienne et les vecteurs principaux du paludisme de la région de Mahasolo (Moyen Ouest de Madagascar). *Archives du Ministère de la Recherche Scientifique et Technologique pour le développement, série Sciences Biologiques n°6*, 79-93.
- 33 RAVELOARIFERA F. et al. 1991, Résultats des enquêtes entomologiques sur le paludisme menées en 1990 sur les Hautes Terres Centrales dans le Sud-Ouest et l'Est de Madagascar. *Archives du Centre National de Recherches sur l'Environnement, numéro spécial Paludisme n° 3*, 37-44.



- 34 RAVOAHANGIMALALA O. et al. 2003, Ecoéthologie des vecteurs et transmission du paludisme dans la région rizicole de basse altitude de Mandritsara, Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot*, **96** (4), pp 323-328.
- 35 RAVOAHANGIMALALA O. 1995, Lutte contre les vecteurs du paludisme : action du toxine CryIV et CytA de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves d'*Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus* (Diptères ; Culucidae) et efficacité sur le terrain. Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Sciences Biologiques Appliquées, Facultés des Sciences, Université d'Antananarivo, 179p.
- 36 RAVOAHANGIMALALA O., THIERY I. et SINEGRE G. 1994, Rice field efficacy of deltamethrin and *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations on *Anopheles gambiae* s.s. in the Anjiro region of Madagascar. In *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, **19**, 169-174.
- 37 RATEFINJANAHARY J. 2004, Rapport final: Résultats des enquêtes parasitologiques. *Rapport F@des*.
- 38 RHODAIN F., PEREZ C. 1985, Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris: Maloine, 458p.
- 39 SCOTT J.A., BROGTON W.G. et COLLINS F.H. 1993, Identification of single specimen of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 520-529.
- 40 SEYOUM A. et al. 2002, Repellency of live potted plants against *An. gambiae* from baits in semifield experimental huts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67(2)**, 191-195.

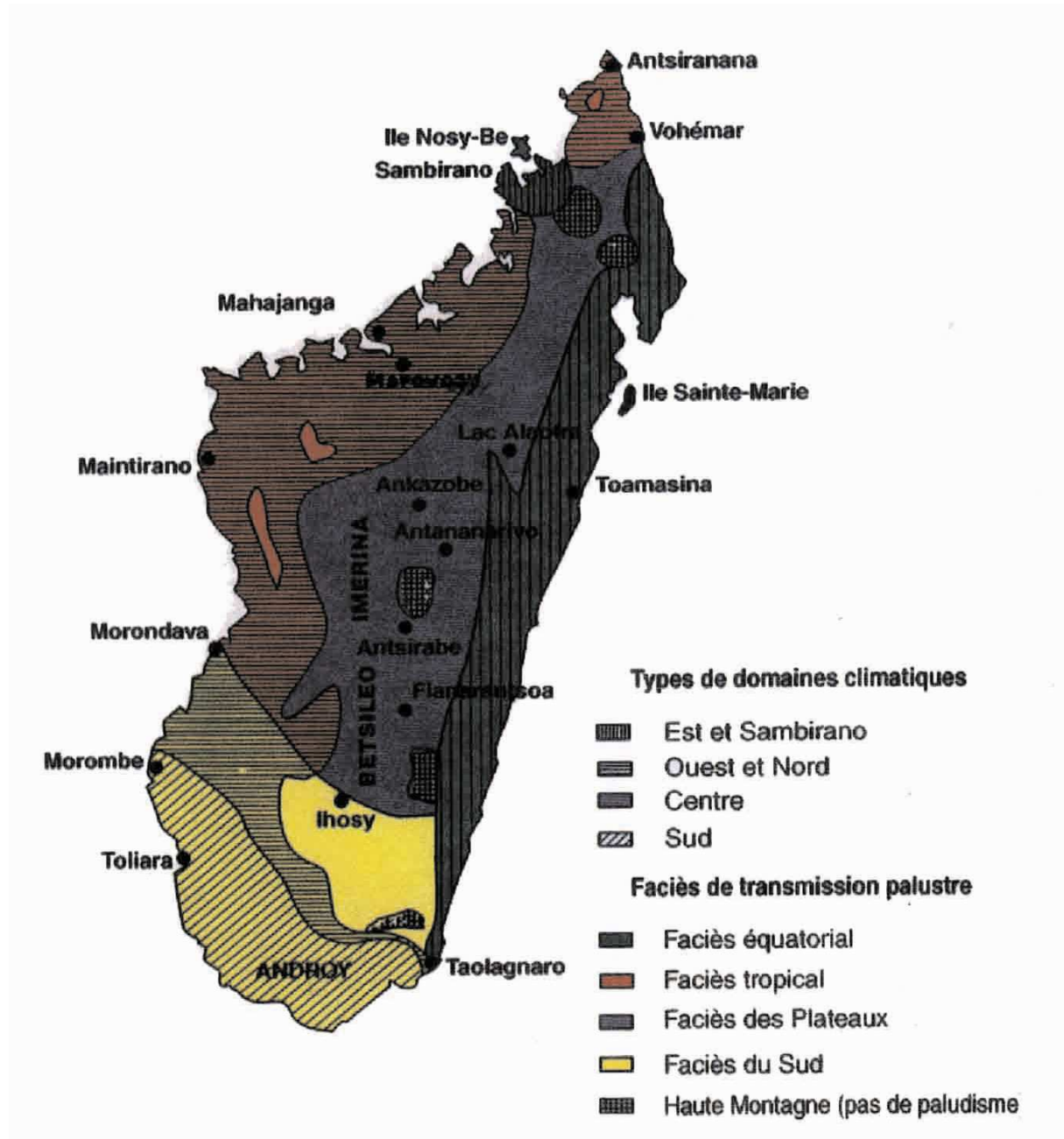


- 41 WHO. 1975, Manual on practical entomology in malaria, Geneva°: WHO Ed., 2 vols.
- 42 WHO. 1975, Manual on practical entomology in malaria, Geneva°: WHO Ed., 2 vols.
- 43 WILSON D.B. 1947, Malaria in Madagascar. *E. Afr. Med. J.*, **24(4)**, 171-176.
- 44 BAUDON D. 2001 Les faciès épidémiologiques.
<http://asmt.louis.free.fr/epidemio.html>.
- 45 BRUNHES J. et al. 1998, Les anophèles de la région afro-tropicale. Logiciel ORSTOM Ed.
- 46 Logiciel NATURE Ed., 2003.
- 47 ROBERT V. 2001, Les vecteurs,
<http://asmt.louis.free.fr/anopheles.html#cycle>
- 48 ROZENDAAL J. A. et al. 1999, Lutte antivectorielle: méthodes à usage individuel et communautaire, Genève: OMS, 449 p.
http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/vector/vecteurs.htm



ANNEXES

Annexe I : Les faciès épidémiologiques du paludisme à Madagascar



(D'après Mouchet et al., 1993)



Annexe II : Calcul de la CL₅₀ et CL₉₀

La CL₅₀ et CL₉₀ ont été obtenues par la méthode d'interpolation linéaire. Si on connaît l'équation de la droite de la forme $y = ax + b$ (donnée par le tableur **MS Excel**), on remplace y par le taux mortalité (par exemple 50% ou 90%) et on calcule x à partir de ce dernier. Ainsi, la CL₅₀ ou CL₉₀ est obtenue.

$$x = \frac{y - b}{a} = \text{CL}_{50} \text{ ou } \text{CL}_{90}$$

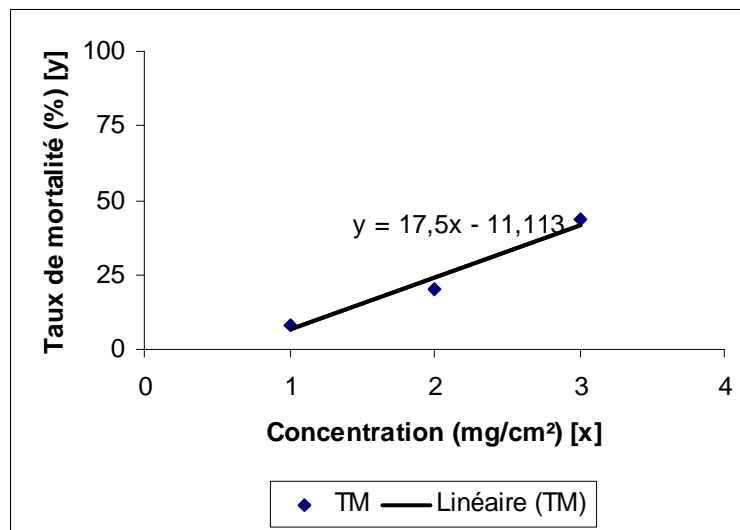


Figure 1 : Droite linéaire montrant le taux de mortalité en fonction de la concentration de la plante codée PKT

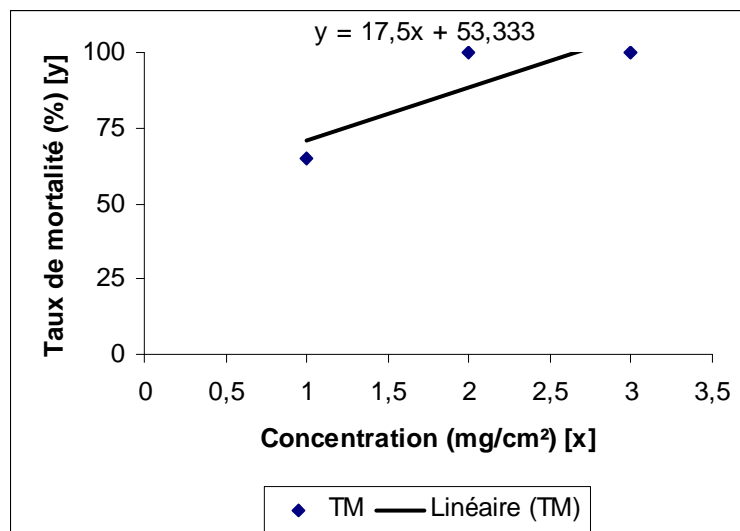


Figure 1 : Droite linéaire montrant le taux de mortalité en fonction de la concentration de la plante codée RDO II



Annexe III : Tableau montrant le rythme d'agressivité nocturne des espèces vectrices

Tableau 1: Rythme d'agressivité nocturne d'*An. gambiae s.l.* à Beforona

| | 18-19 | 19-20 | 20-21 | 21-22 | 22-23 | 23-00 | 00-01 | 01-02 | 02-03 | 03-04 | 04-05 | 05-06 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extérieur | 0,46 | 0,25 | 1,08 | 1,33 | 1,63 | 1,83 | 3,21 | 2,46 | 2,00 | 3,25 | 4,58 | 2,38 |
| Intérieur | 0,17 | 0,08 | 0,33 | 0,21 | 0,38 | 0,33 | 0,46 | 0,54 | 0,83 | 0,71 | 0,38 | 0,38 |

Tableau 2: Rythme d'agressivité nocturne d'*An. funestus* à Beforona

| | 18-19 | 19-20 | 20-21 | 21-22 | 22-23 | 23-00 | 00-01 | 01-02 | 02-03 | 03-04 | 04-05 | 05-06 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extérieur | 0,08 | 0,21 | 0,33 | 0,63 | 0,79 | 1,00 | 0,58 | 0,38 | 0,54 | 0,63 | 0,33 | 0,50 |
| Intérieur | 0,08 | 0,17 | 0,00 | 0,21 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,08 | 0,00 |

Tableau 3: Rythme d'agressivité nocturne d'*An. gambiae s.l.* à Marozevo

| | 18-19 | 19-20 | 20-21 | 21-22 | 22-23 | 23-00 | 00-01 | 01-02 | 02-03 | 03-04 | 04-05 | 05-06 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extérieur | 0,20 | 0,40 | 1,60 | 0,67 | 0,60 | 0,80 | 1,73 | 1,13 | 2,33 | 4,00 | 3,53 | 2,73 |
| Intérieur | 0,33 | 0,56 | 1,22 | 1,41 | 1,26 | 1,63 | 1,56 | 1,41 | 1,74 | 1,85 | 2,52 | 1,96 |

Tableau 4: Rythme d'agressivité nocturne d'*An. funestus* à Marozevo

| | 18-19 | 19-20 | 20-21 | 21-22 | 22-23 | 23-00 | 00-01 | 01-02 | 02-03 | 03-04 | 04-05 | 05-06 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extérieur | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,13 | 0,00 | 0,00 |
| Intérieur | 0,00 | 0,04 | 0,07 | 0,11 | 0,15 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,00 | 0,07 | 0,19 | 0,04 |

Tableau 5: Rythme d'agressivité nocturne d'*An. gambiae s.l.* à Soa

| | 18-19 | 19-20 | 20-21 | 21-22 | 22-23 | 23-00 | 00-01 | 01-02 | 02-03 | 03-04 | 04-05 | 05-06 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extérieur | 0,00 | 3,50 | 2,00 | 2,50 | 0,00 | 2,00 | 2,50 | 2,00 | 2,00 | 3,50 | 8,50 | 4,50 |
| Intérieur | 0,00 | 0,90 | 1,70 | 2,00 | 1,70 | 1,90 | 1,30 | 1,90 | 1,40 | 1,90 | 2,70 | 1,50 |

Tableau 6: rythme d'agressivité nocturne d'*An. funestus* à Soa

| | 18-19 | 19-20 | 20-21 | 21-22 | 22-23 | 23-00 | 00-01 | 01-02 | 02-03 | 03-04 | 04-05 | 05-06 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extérieur | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Intérieur | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |