

SOMMAIRE

Dédicaces	i
Remerciements	ii
LISTE DES FIGURES.....	xi
I. INTRODUCTION GENERALE.....	- 1 -
I.1. Les facies épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso	- 2 -
I.2. Les vecteurs de l'agent pathogène.....	- 2 -
I.3. Mesure de la transmission	- 3 -
I.3.1. La capacité vectorielle.....	- 3 -
I.3.2. La compétence vectorielle	- 3 -
I.4. Bio-écologie d'<i>Anopheles sp</i>	- 4 -
I.4.1. La phase pré-imaginale ou la phase aquatique.....	- 4 -
I.4.2. La phase imaginaire ou la phase aérienne.....	- 4 -
I.5. La résistance aux insecticides	- 5 -
I.5.1. Les insecticides utilisés en santé publique.....	- 5 -
I.5.2. Les mécanismes de résistances aux insecticides.....	- 6 -
I.6. Le complexe <i>An. gambiae s.l.</i>.....	- 7 -
I.7. Le groupe <i>An. funestus</i>	- 8 -
I.8. <i>Anopheles rufipes s.l</i>	- 8 -
II. OBJECTIFS	- 9 -
II.1. Objectif général.....	- 9 -
II.2. Objectifs spécifiques	- 10 -
III. MATERIEL ET METHODES	- 11 -
III.1. Suivi de la densité d'<i>Anopheles rufipes</i> et d'<i>Anopheles gambiae s.l.</i> au cours du temps et présence de <i>Plasmodium falciparum</i>	- 11 -
III.1.2 Echantillonnage	- 12 -
III.1.3. Identification des moustiques	- 13 -

III.1.4. Extraction de l'ADN génomique	- 16 -
III.1.5. PCR-ITS-2rDNA pour l'identification des espèces au sein du genre d' <i>Anopheles</i>	- 16 -
III.1.6. PCR d'identification des espèces au sein du complexe <i>An. gambiae s.l</i>	- 17 -
III.1.7. PCR diagnostique de l'infection du moustique par <i>Plasmodium falciparum</i>	- 18 -
III.1.8. Tests ELISA pour l'identification de l'origine du repas sanguin des moustiques gorgés.....	- 18 -
III.2. Etudes en laboratoire: longévité et infections expérimentales.	- 19 -
III.2.1. Elevage des moustiques	- 19 -
III.2.2. Longévité	- 19 -
III.2.3. Infections expérimentales	- 20 -
III.3. Les analyses statistiques et le traitement des données	- 22 -
IV. RESULTATS.....	- 24 -
IV.1. Collecte d'anophèles à Soumoussou.....	- 24 -
IV.1.1. Effet de la période d'échantillonnage, du type de maison et du quartier sur le nombre de moustiques collectés.....	- 24 -
IV.1.2. Effet de l'espèce, de la période de collecte, du type de maison et du quartier sur le taux de gorgement.....	- 26 -
IV.2. Infection par <i>Plasmodium falciparum</i> des anophèles collectés	- 27 -
IV.3. Tests ELISA pour l'origine du repas de sang des moustiques gorgés	- 28 -
IV.5. Longévité	- 30 -
IV.6. Infections expérimentales	- 31 -
IV.6.1. Taux de gorgement lors des expériences	- 31 -
IV.6.2. Taux d'infection en sporozoïtes des femelles <i>An. rufipes</i> et d' <i>An. coluzzii</i>	- 31 -
V. DISCUSSION.....	- 33 -
V.1. Bio-écologie comparative d'<i>An rufipes</i> et <i>An. gambiae s.l.</i>	- 33 -
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	- 36 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 37 -

Titre : Rôle d'*Anopheles rufipes* dans la transmission de *Plasmodium falciparum* à Soumoussou, au Sud-ouest du Burkina Faso

Résumé

L'implication d'*Anopheles rufipes* dans la transmission de *Plasmodium falciparum* au Nord et au Sud-ouest du Burkina Faso a été mise en évidence dès les années 1950-1960. Cinquante ans plus tard, une seule étude a tenté de réactualiser le rôle de vecteur de cette espèce, mais ne s'est intéressée qu'à la recherche d'oocystes dans les estomacs des moustiques. Afin de pouvoir statuer sur le rôle effectif de vecteur d'*An. rufipes*, nous avons mené une approche résolument comparative entre les différentes espèces anophéliennes majoritairement rencontrées à Soumoussou, au Sud-ouest du Burkina Faso. Sur le terrain, d'octobre à décembre, nous avons comparé la bio-écologie d'*An. rufipes*, *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* au niveau de trois quartiers différents en déterminant les densités (pulvérisations intra-domiciliaires de pyrethrinoïdes) et les habitudes trophiques (ELISA-repas de sang sur les estomacs de femelles gorgées) des espèces en fonction du type d'habitat (maisons habitées vs maisons non habitées). Par ailleurs, nous avons recherché la présence de sporozoites dans les glandes salivaires des femelles capturées en utilisant la technique de PCR. Au laboratoire, nous avons comparé la survie moyenne d'*An. rufipes* et d'*An. coluzzii* et évalué, au cours d'expériences d'infections expérimentales, la susceptibilité de ces deux espèces à *P. falciparum*. Ainsi, nous avons pu montrer que la proportion d'*An. rufipes* trouvée sur le terrain augmente au cours du temps (de 3 à 20% entre Septembre et Novembre) quel que soit le type d'habitat, favorisant sûrement, potentiellement, le contact homme-vecteur en début de saison sèche. Bien que majoritairement zoophile, l'indice d'anthropophilie d'*An. rufipes* peut atteindre 25% dans les maisons habitées. La survie d'*An. rufipes* est significativement supérieure à celle d'*An. coluzzii* avec une espérance de vie de 29.4 ± 0.6 jours en moyenne contre 24.9 ± 0.6 ($P < 0,001$), et est donc tout à fait compatible avec un rôle potentiel de vecteur de *P. falciparum*. Cependant, nos données, préliminaires, suggèrent que les femelles *An. rufipes*, bien que compétentes à transmettre *P. falciparum*, montrent une susceptibilité plus faible à l'infection ($P < 0,05$), en accord avec l'absence de femelles porteuses de sporozoites sur le terrain (0/89). Bien que notre effectif de terrain soit sûrement trop faible pour pouvoir définitivement statuer sur le rôle potentiel d'*An. rufipes* dans la transmission de *P. falciparum* à Soumoussou, nos données illustrent pour la première fois la capacité théorique d'*An. rufipes* à transmettre le parasite. Par ailleurs, si sa faible susceptibilité à *P. falciparum* venait à être confirmée par des expériences complémentaires, *An. rufipes* pourrait constituer une espèce modèle pour l'étude des déterminants génétiques de la résistance à l'infection.

Mots clefs: *An. rufipes*, *P. falciparum*, vecteur, Soumoussou, préférences trophiques, infections expérimentales, compétence

Title: Role of *Anopheles rufipes* in the transmission of *Plasmodium falciparum* in the village of Soumousso, south-western Burkina Faso

Summary

Around the late fifties, *An. rufipes* has been described as a vector of *Plasmodium falciparum* in the North and in the South-West of Burkina Faso. Since then, only one study has attempted to determine if this species still constitute a malaria vector, but considering oocyst prevalence in the field only. To further determine whether or not *An. rufipes* constitutes nowadays a threatening mosquito, we compared the bio-ecology of major *Anopheles* species of the village of Soumousso by following their densities from the rainy season to the beginning of the dry one, in habited as well as inhabited dwellings. We also determined the trophic preferences of the females as well as the sporozoite prevalence. In the lab, we determined whether the survival of *An. rufipes* females is compatible with a potential role in *P. falciparum* transmission and evaluated the competence of this species using experimental infection with field isolates of the parasite. In the fields, our data describe an increase in the proportion of *An. rufipes* at the onset of the dry season (3% in September to 20% in November) which might increase the probability of the human-vector contact. Accordingly, although highly zoophilic, a rather high index of antropophily (25%) has been found for this species in habited dwellings. In the lab, *An. rufipes* has been found to live longer than *An. coluzzii* with a survival rate of respectively, 29.4 ± 0.6 days in average vs 24.9 ± 0.6 ($P < 0.001$). Although *An. rufipes* is competent to transmit *P. falciparum* as shown by the experimental infections we performed, its susceptibility to the parasite is inferior to *An. coluzzii*'s ($P < 0.05$), which might constitute an explanation to the absence of *An. rufipes* females with sporozoites in their salivary glands in the field (0/89). Although our sample size might not reach statistical significance to demonstrate that *An. rufipes* is a malaria vector in Soumousso, our data allow for the first time to theoretically involve this species in the transmission of *P. falciparum*. Moreover, if its limited susceptibility is confirmed by further studies, *An. rufipes* could represent a model species to study genetic determinants of refractoriness to the parasite.

Key words: *An. rufipes*, *P. falciparum*, vector, Soumousso, experimental infections, trophic preferences, competence

SIGLES ET ABREVIATIONS

<i>Ace</i>	Acétylcholinestérase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
<i>An :</i>	<i>Anopheles</i>
CFR :	Capture de la Faune Résiduelle
CSP :	Circumsporozoïtes de <i>Plasmodium</i>
CSPS :	Centre de Santé et de Promotion Sociale
CTAB :	Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide
°C :	dégrée Celsius
CI	Confidence interval
D :	Dark
DEET :	Di Ethyl-m-Toluamide
dNTPs:	désoxy Nucléoside Tri Phosphates
DRO :	Direction Régionale de l'Ouest
ELISA:	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
etc:	Etcetera
GLM:	Generalized Linear Model
HBI:	Human Blood Index
I.A:	Indice d'Anthropophilie
IgG:	Immunoglobine G
IN.S.SA:	Institut Supérieur des Sciences de la Santé
IRSS:	Institut de Recherche en Science de Santé
ITS:	Internal Transcribed Spacer
KD:	Knock Down
Kdr:	Knock down resistant
Km:	Kilometre
L :	Light
LAV:	Lutte anti-vectorielle
M:	Mopti
MgCl₂ :	Chlorure de Magnésium
MH :	Maison Habitée

MIII :	Matériaux Imprégnés d’Insecticides
MILDA :	Moustiquaire imprégnée a Longue Durée d’Action
mL :	Millilitre
mn :	Minute
MNH :	Maison Non Habitée
mV :	MilliVolt
N :	North
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
pb :	paire de base
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PID :	Pulvérisation Intra- Domiciliaire
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
<i>Pf:</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
rDNA:	ribosomal Desoxyribo Nucleotide Acid
RIDL:	Release of Insects Carrying Dominant Lethal
rpm:	rotation par minute
S :	Savannah
<i>s.l :</i>	<i>Sensus lato</i>
SINE:	Short INterspersed Elements
<i>s.s :</i>	<i>sensu stricto</i>
Taq :	<i>Thermophilus aquaticus</i>
µl :	Microlitre
UV :	Ultra-Violet
<i>var :</i>	Variété
VK :	Vallée du Kou
<i>vs :</i>	Versus
W:	West
WHO:	World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle biologique des anophèles.	- 5 -
Figure 2: Cartographie du site d'étude.	- 12 -
Figure 3 : Illustration des caractères morphologiques d'<i>An rufipes</i>	- 14 -
Figure 4: Illustration des caractères morphologiques d'<i>An. gambiae.s.l.</i>	- 15 -
Figure 5: Illustration des caractères morphologiques d'<i>An funestus</i>	- 16 -
Figure 6: Schéma du protocole de prospection parasitologique et dispositif d'infection expérimentale	- 21 -
Figure 7: Effet de la période, du type de maison sur la densité des femelles <i>An gambiae s.l.</i>, <i>An funestus</i> et <i>An rufipes</i> collectées à Soumousso	- 25 -
Figure 8: Effet de la période sur la densité des femelles <i>An gambiae s.l.</i>, <i>An funestus</i> et <i>An rufipes</i> collectées à Soumousso	- 26 -
Figure 9: Effets de l'espèce et du type de maison sur le taux de gorgement des moustiques.....	- 27 -
Figure 10 : Courbe de survie de Kaplan Meier des femelles d'<i>An. coluzzii</i> et d'<i>An. rufipes</i>, tous réplicats confondus	- 30 -
Figure 11 : Taux d'infection en sporozoïtes de <i>Pf</i> des femelles d'<i>An. coluzzii</i> et d'<i>An. rufipes</i> à J14 post-infection	- 32 -

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Tableau comparatif montrant les caractères morphologiques différentiels des femelles adultes d'<i>An. gambiae s.l.</i>, d'<i>An. funestus</i> et d'<i>An. rufipes</i>	- 13 -
Tableau II : Origine des repas de sang d'<i>An gambiae s.l</i> et d'<i>An rufipes</i> gorgés des maisons habitées et non habitées de Soumousso	- 29 -

TABLE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN au CTAB
Annexe 2: Protocole PCRs
Annexe 3: Protocole ELISA-repas de sang

I. INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme est une parasitose causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* et transmis à l'homme par la piqûre de la femelle de certaines espèces de moustique du genre *Anopheles*. Il demeure de nos jours, un problème majeur de santé publique. Selon les estimations de l'OMS, 1,2 milliard de personnes vivent dans des zones fortement endémiques particulièrement en Afrique (47%) et en Asie du Sud-est (37%). En conséquence, il a été estimé qu'en 2013, 198 millions de cas dont 584.000 décès étaient imputables au paludisme[1]. La plupart des décès estimés à (90 %) ont lieu en Afrique subsaharienne chez les enfants de moins de cinq ans (78 %). Elle constitue pour cela une menace pour les populations vulnérables que sont les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans. Au Burkina Faso, le nombre total de cas de paludisme enregistrés dans les formations sanitaires en 2013, 6.731.792 cas dont 414.234 cas de paludisme grave (6,2% des cas) ont été enregistrés. Au plan national, la létalité du paludisme est de 1,5%. Elle est plus élevée chez les moins de cinq ans (2,4%). Chez les femmes enceintes elle est de 0,3% et est importante dans les régions du Plateau central (2,9%), et de la Boucle du Mouhoun (1,5%). Chez les moins de cinq ans, elle est relativement plus élevée dans les régions de la Boucle du Mouhoun (3,1%), dans le sahel (3,9%) et dans la région des Hauts-Bassins (3,8%) [2]. Cinq espèces de *Plasmodium* sont responsables de la maladie dans le monde: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*, dont les premiers cas humains ont été décrits en 2004 [3]. La forte mortalité infantile au Burkina Faso est associée à *Plasmodium falciparum* dans plus de 90% des cas, suivi de *Plasmodium malariae* (3-8%) et de *Plasmodium ovale* (0,5-2%). Les principaux vecteurs du paludisme au Burkina Faso sont les espèces appartenant au complexe *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus* [4].

Les principales mesures de contrôle de cette maladie recommandées par l'OMS reposent sur : la lutte anti-vectorielle (LAV) dont les principaux outils majeurs sont l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) et la pulvérisation intra-domiciliaire (PID). Les MILDA permettent une réduction de 20 à 63% de la mortalité associée au paludisme [5] tandis que les PID ont montré leur efficacité contre les vecteurs endophiles/endophages [6]. Cependant l'efficacité de la LAV se trouve limitée à cause des problèmes de résistance des vecteurs aux insecticides couramment utilisés montrant ainsi une baisse de l'efficacité des mesures de contrôle des vecteurs de *Plasmodium*. Cependant la

mauvaise connaissance des vecteurs responsables de la transmission du parasite dans certaines localités a également conduit à l'échec des stratégies de contrôle des vecteurs. Pour un contrôle efficace de la LAV, des prospections entomologiques de surveillance s'avèrent nécessaires pour la connaissance de la bio-écologie des vecteurs cibles, responsables du paludisme [7]. La LAV, longtemps considérée comme l'une des premières méthodes de prévention [8] contre le paludisme, pour être efficace doit être basée sur une identification spécifique, voire sub-spécifique, des vecteurs et une connaissance approfondie de leur biologie dans les zones considérées [9].

I.1. Les facies épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso

Dans ce pays, le paludisme est endémique et constitue un problème majeur de santé publique. La transmission est stable dans tout le pays, avec une recrudescence saisonnière durant la période de mai à octobre. La transmission de l'hématozoaire est assurée par les principaux vecteurs que sont: *An. gambiae* s.s, *An. arabiensis* [10] et *An. funestus* [11]; l'existence d'*An. nili* a aussi été rapportée [12]. Les faciès épidémiologiques se superposent aux zones climatiques. Il existe 3 faciès de transmission du paludisme : une transmission permanente dans les régions du Sud et du Sud-ouest qui dure toute l'année, une transmission saisonnière longue au centre d'une durée de 4-6 mois et une transmission saisonnière courte au nord du pays d'une durée de 2 à 3 mois avec des risques potentiels d'épidémies de paludisme [13].

I.2. Les vecteurs de l'agent pathogène

Les vecteurs du plasmodium humain sont des arthropodes appartenant tous à la classe des insectes, à l'ordre des Diptères, à la famille des Culicidés [14]. Connue sous le nom courant de << moustiques >>, cette famille est divisée en 2 sous-familles : les *Culicinae* et les *Anophelinae*. C'est dans cette dernière sous-famille que l'on rencontre le genre *Anopheles* regroupant les vecteurs de toutes les espèces de *Plasmodium* parasitant les sujets humains. Environ 41 espèces différentes d'anophèles jouent le rôle de vecteurs de paludisme humain [15]. En 2009, quatre principaux vecteurs de *Plasmodium* étaient présents dans le Sud-ouest du Burkina Faso notamment à Soumoussou: *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. nili* [16].

I.3. Mesure de la transmission

I.3.1. La capacité vectorielle

La capacité vectorielle est le nombre d'inoculations attendues, par jour à partir d'un cas humain infecté en contact avec une population anophélienne. Elle mesure ainsi le potentiel de transmission du parasite. La capacité vectorielle est corrélée par : le taux de reproduction des anophèles, le taux d'inoculation entomologique et la longévité des vecteurs.

I.3.2. La compétence vectorielle

La compétence vectorielle désigne l'aptitude intrinsèque du vecteur à s'infecter et à assurer le développement du *Plasmodium* et à le transmettre [17]. Un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques, immunitaires...) régulent la susceptibilité du vecteur à l'infection, à la multiplication et à la transmission du parasite [18]. Cependant d'autres facteurs extrinsèques, non génétiques tels que la température ambiante, l'apport nutritif des larves et des adultes, la flore microbienne de l'estomac, ainsi que les traits d'histoire de vie des moustiques infectés affectent la capacité du vecteur à supporter la sporogonie du parasite et sa transmission à l'hôte vertébré lors d'une piqûre [19].

La compétence vectorielle peut se mesurer au laboratoire en utilisant la technique d'infections expérimentales : les moustiques peuvent être exposés à une dose donnée de gamétoцитes tout au long de leur repas sanguin sur un animal vertébré, « Direct Feeding Assay » ou à travers une membrane contenant des parasites obtenus en culture, « Standard Membrane Feeding Assays » ou encore une membrane contenant du sang des porteurs naturels de gamétoцитes, « Direct Membrane Feeding Assays ». Chacune de ces approches mesure les traits liés à l'infection qui caractérisent le succès ou l'échec de l'infection et ensuite de la compétence vectorielle. Ces traits sont :

-la prévalence parasitaire: c'est la proportion de moustiques exposés à l'infection contenant au moins un oocyste dans leur estomac (prévalence en oocystes) ou de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires (prévalence en sporozoïtes). Une faible prévalence traduit un grand état réfractaire du moustique vis-à-vis du parasite quant à son établissement chez ce dernier et/ou une faible infectivité du parasite;

-l'intensité de l'infection: c'est le nombre d'oocystes présents dans l'estomac ou le nombre de sporozoïtes présents dans les glandes salivaires des moustiques infectés. Une faible

intensité indique une forte résistance du moustique contre la prolifération du parasite en son sein et/ou une faible capacité de développement du parasite [19].

I.4. Bio-écologie d'*Anopheles sp*

Les anophèles, insectes holométaboles possèdent un cycle de développement passant par quatre stades: le stade zygotique, le stade larvaire, le stade nymphal et, enfin, le stade imago (adulte). Les trois premiers stades se déroulent en milieu aquatique et durent, en tout, entre 7 jours et 5 semaines selon l'espèce et, surtout, la température ambiante. Le stade adulte se déroule en milieu aérien et dure environ une semaine pour le mâle et jusqu'à deux mois pour la femelle.

I.4.1. La phase pré-imaginale ou la phase aquatique

Les femelles adultes pondent 50 à 200 œufs à la surface de l'eau mesurant 0.5 x 0.2 mm. Ces œufs peu résistants à la sécheresse, possèdent des flotteurs latéraux ; ils éclosent en 2 à 3 jours en climat tropical. Les larves passent la majeure partie de leur temps à s'alimenter d'algues, de bactéries, et d'autres micro-organismes juste sous la surface de l'eau. En effet la larve d'anophèle passe par 3 mues la menant d'une longueur de 1mm au stade 1 à 5–8mm au stade quatre. A la nymphose, la pupe ressemble à une virgule et la pupaison se réalise à l'intérieur de la cuticule. La pupe cesse de se nourrir et est obligée de venir fréquemment à la surface de l'eau pour respirer. Après 1 à 2 jours, la surface dorsale du puparium (capsule durcie qui enveloppe la pupe) se fend longitudinalement et l'imago émerge.

I.4.2. La phase imaginale ou la phase aérienne

L'adulte qui vient d'émerger reste immobile pendant 24h, le temps que sa cuticule sèche, que ses ailes se déploient et que son appareil reproducteur soit fonctionnel. Les adultes mâles qui émergent en premier ont une durée de vie plus courte tandis que les femelles peuvent vivre jusqu'à 4 semaines. Mâles et femelles se nourrissent de nectar et de jus de plante car ils ont besoin de sucres comme source d'énergie. Seules les femelles sont hématophages et doivent prendre un repas sanguin, voire 2 ou 3 s'il s'agit de femelles nullipares, afin de permettre aux œufs de se développer dans les ovaires. La copulation a lieu dans les 48 h suivant l'émergence de l'adulte. La femelle n'est fécondée qu'une seule fois dans sa vie et les mâles peuvent féconder plusieurs femelles. 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 stockés dans une spermathèque, dont ils sont extraits progressivement

pour féconder la totalité des œufs qu'elles produisent pendant le reste de leur vie. L'activité de reproduction (repas sanguin, maturation des œufs et ponte) est répétée plusieurs fois au cours de la vie du moustique et s'appelle le cycle gonotrophique. Chez *An. gambiae*, le cycle prend 48 heures lorsque la moyenne de température jour/nuit est de 23°C.

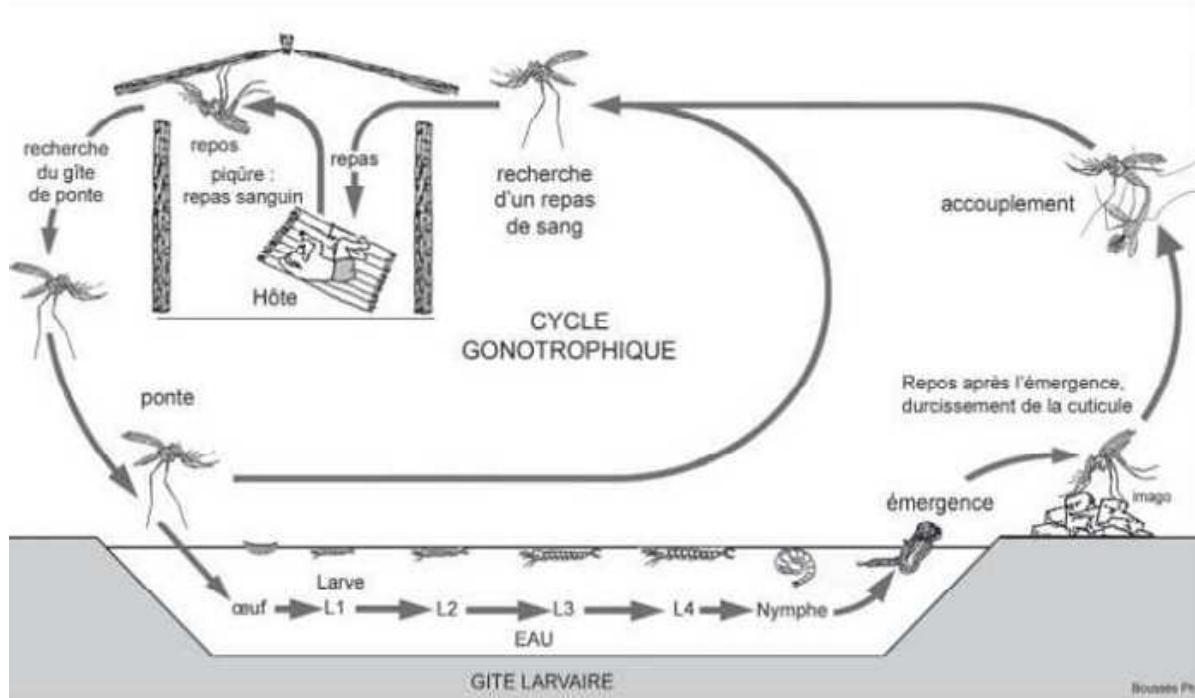


Figure 1: Cycle biologique des anophèles.

I.5. La résistance aux insecticides

I.5.1. Les insecticides utilisés en santé publique

Trois grandes familles de produits chimiques constituent les insecticides utilisés en LAV : les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. La principale cible de ces insecticides est le système nerveux des insectes ; en effet près de 90% des insecticides sont neurotoxiques. Les organophosphorés et les carbamates inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine et sont à l'origine d'une hyperactivité de l'insecte conduisant à sa mort. Les pyréthrinoïdes quant à eux sont classés en deux groupes selon la structure chimique et le mode d'action : les groupes I et II. Ce sont tous des modulateurs des canaux voltage-dépendants qui sont à l'origine de la phase de dépolarisation du potentiel d'action. Les pyréthrinoïdes de groupes I et II diffèrent par l'absence ou la présence, respectivement d'une liaison alpha-cyanée. Ceux de type II inactivent plus longtemps les canaux sodium que ceux de type I. Cette action neurotoxique des pyréthrinoïdes aboutit à des

convulsions puis à la tétanie de l'insecte. Les organophosphorés et les pyréthrinoïdes sont les principaux insecticides utilisés en santé publique. Les pyréthrinoïdes demeurent de nos jours les seuls insecticides recommandés pour l'imprégnation des moustiquaires en raison de leur rapidité d'action à faible dose (effet knock-down ou KD), leur effet excito-répulsif et leur innocuité pour l'homme [20].

I.5.2. Les mécanismes de résistances aux insecticides.

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides se définit comme étant la capacité des individus d'une espèce de survivre à une dose d'une substance toxique, mortelle pour la majorité des individus de cette population. C'est la conséquence d'une mutation génétique au sein d'une population de vecteurs en réponse à une pression de sélection. Les résistances aux deux principales familles d'insecticides (organophosphorés et pyréthrinoïdes) utilisées dans la lutte contre le paludisme sont de deux types : la résistance métabolique et la résistance par modification de cible ;

-la résistance métabolique : la résistance métabolique se traduit par l'accroissement de l'activité d'enzymes assurant la détoxication des insecticides, soit par la modification de la conformation de l'enzyme, soit par une production accrue de protéines [21];

-la résistance par modification de la cible : les cibles principales des pyréthrinoïdes et des organophosphorés sont des protéines jouant un rôle dans la transmission de l'influx nerveux, le canal sodium ou l'acétylcholinestérase. Le canal sodium codé par le gène *kd* (know-down) peut entraîner des mutations qui aboutissent à une faible affinité de ce canal aux insecticides conduisant à un nouvel gène «*kdr*» (know down résistant) [22] qui est due à une mutation par substitution d'un acide aminé la leucine par un autre la phénylalanine. Ainsi deux mutations L1014F et L1014S codant pour ce gène «*kdr*» et montrant une résistance accrue aux pyréthrinoïdes ont été retrouvées respectivement de façon fréquente dans les populations d'*An. gambiae s.l* de l'Afrique de l'Ouest [23] et de l'Afrique de l'Est. L'augmentation de la quantité d'acétylcholinestérase [24] ou la diminution de son affinité pour les insecticides [25] codant pour le gène *Ace-1* seraient à l'origine de la résistance aux organophosphorés. La mutation est due à une substitution d'un acide aminé la glycine par un autre, la sérine.

I.6. Le complexe *An. gambiae* s.l

Le complexe *An. gambiae* s.l (*sensu lato*) présente actuellement 7 espèces morphologiquement identiques au stade adulte. Il arrive souvent qu'*An. arabiensis* remplace *An. gambiae* s.s dans son rôle de vecteur majeur du paludisme en zones urbaines et périurbaines dans la région de Bobo-Dioulasso [26]. *An gambiae* s.s. a été reconnu comme composé de plusieurs formes chromosomiques (5 en Afrique de l'Ouest: les formes Forêt, Savane, Bissau, Mopti et Bamako) [27, 28]. La prévalence de ces formes répond essentiellement aux variations climatiques [28, 29]. Le développement d'outils moléculaires d'identification a permis de définir deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*.s qui correspondent respectivement aux formes chromosomiques Mopti et Savane [30]. Désormais le comité international de nomenclature zoologique a nommé la forme moléculaire M, *Anopheles coluzzii* en l'honneur au regretté Professeur Mario Coluzzi qui a consacré une grande partie de sa vie à l'étude de ce complexe d'espèces en Afrique de l'Ouest, et la forme S, *Anopheles gambiae* Giles [31]. En effet, les études récentes sur le complexe majeur de la transmission du paludisme ont montré qu'*An coluzzii* est plus susceptible à l'infection par *Plasmodium falciparum* au Cameroun que *An gambiae* [32]. Par contre, au Sénégal la forme moléculaire S est plus susceptible [33]. Les 2 espèces naissantes, *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont une susceptibilité équivalente à l'infection plasmodiale selon un étude réalisée au Mali [34]. Toutefois, une étude récente a montré une susceptibilité similaire à l'infection de *Plasmodium falciparum* dans le centre du Burkina Faso entre les formes moléculaires *An gambiae* et *An coluzzii* et *An arabiensis* [35]. Dans les conditions de laboratoire, *An coluzzii* possède une grande capacité de stocker des réserves nutritives au cours des stades larvaires lui conférant une meilleure réussite de maturation des ovaires à partir d'un seul repas de sang qu'*An gambiae* [36]. Les larves d'*An. gambiae* s.s et d'*An. arabiensis* se développent de préférence dans les eaux douces, peu chargées en matière organique, peu profondes, calmes, ensoleillées et sans végétation [37]. On les retrouve aussi dans des gîtes anthropiques tels que les surfaces irriguées, les barrages et les fosses. *An. arabiensis* peuple aussi les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara mais peut aussi s'adapter aux eaux polluées des grandes villes de l'Afrique occidentale [26, 37]. La phase aquatique des anophèles peut durer, en zone tropicale, d'une à trois semaines en fonction de l'espèce et de la température. Elle est de 10 à 12 jours pour *An gambiae* s.l.

I.7. Le groupe *An. funestus*

Le groupe *funestus* compte 5 sous-groupes dont 3 sont présents en Afrique tropicale: ce sont le sous-groupe *funestus*, le sous-groupe *rivolorum* et le sous-groupe *minimus*. Les espèces *An. funestus*, *An. leesonii* et *An. rivolorum* sont largement présentes sur l'ensemble de l'Afrique sub-saharienne. L'espèce *An. funestus* est répandue dans toute l'Afrique sub-saharienne sauf dans les parties très sèches du Sud, du Nord et de l'Est du continent. Toutefois elle est très localisée dans les grandes forêts du Centre. *An. funestus*, qui a besoin d'ombre pour se développer, pullule au niveau des marais à végétation dressée et au niveau des rizières. Il peut être associé à un paludisme stable ou instable suivant le contexte épidémiologique. *An. funestus* s.s représente le principal vecteur du sous-groupe *funestus*, avec des indices sporozoïtiques proches d'*An. gambiae* s.l de 5%. Récemment, des analyses moléculaires ont mis en évidence l'existence d'une nouvelle entité, *An. rivolorum-like* présente à Soumoussou, localité au Sud-ouest du Burkina Faso [38]. En Afrique de l'Ouest, *An. funestus* présente un important polymorphisme génétique mis en évidence par l'étude des inversions chromosomiques [11, 39]. Deux formes chromosomiques ont ainsi été identifiées, Folonzo et Kiribina. Folonzo semble être favorisée dans les zones présentant des réservoirs avec une végétation savane classique naturelle tandis que Kiribina est plus souvent capturée dans les zones rizicoles [38]. Au Burkina Faso, ces deux formes constituent les principaux vecteurs avec une anthropophilie et un indice sporozoïtique respectivement supérieures à 89% et 8% malgré une forte exophilie observée chez Kiribina [40]. Des études récentes ont montré la sensibilité d'*An. funestus* aux pyréthrinoïdes couramment utilisés en PID et dans les MII. Cet anophèle est abondant en fin de saison des pluies et au début de saison sèche où il peut alors prendre le relais d'*An. gambiae* dans la transmission du paludisme [16].

I.8. *Anopheles rufipes* s.l

Anopheles rufipes est une espèce africaine à large répartition marquant une nette préférence pour les zones de sahel et de savane du nord de l'Afrique occidentale et centrale. C'est un culicidé de la sous-famille des *Anophelinae*, du genre *Anopheles* comprenant deux sous espèces, *An. rufipes rufipes* et *An. rufipes broussesi*. Le troisième article de cette espèce au niveau du tarse postérieur possède une bande noire plus grande que la moitié de l'article. Deux petites bandes tachetées sont sous la Costa de l'aile. Les palpes montrent deux bandes tachetées larges à l'apex contre une bande tachetée étroite.

Le rôle épidémiologique d'*An. rufipes* dans la transmission du paludisme a été rapporté dans le Nord et le Sud-ouest du Burkina Faso par Holstein en 1951. Cette espèce a vu son rôle vectoriel discuté dans la littérature malgré la présence des sporozoïtes dans ses glandes salivaires à partir de nombreuses études : 11.52% de femelles disséquées (6/52) hébergeaient des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires à Bobo [41]. Les indices sporozoïtiques d'*An. rufipes* (16.6%) dépassaient ceux d'*An. gambiae s.l* (12%) et d'*An. funestus* (0%) dans la région de Bobo entre le 1^{er} janvier et le 30 mars 1950 [41]. Dans la région de Banfora des indices sporozoïtes variables, 3,7 %, 6 ,4%, 7,1% en saison sèche 14,8%, 16 ,9% en fin d'hibernation ont été rapportés où *An. rufipes* était le vecteur majeur du paludisme [42]. En l'absence ou du faible pourcentage d'*An. gambiae* et d'*An. funestus*, *An. rufipes* était vecteur du paludisme après découverte de sporozoïtes dans les glandes salivaires présentant un index sporozoïtique de 1,6%(2 sur 127) à Dori [42]. Aussi Hamon et Mouchet ont trouvé en 1961 en Haute-volta 1,2% de femelles positives (infectées de sporozoïtes) parmi les anophèles *rufipes rufipes* disséquées.

Une étude récente a noté l'infection d'*An. rufipes* par des oocystes de *Plasmodium* (1/87) dans le village de Soumoussou mais pas de sporozoïtes à partir de l'ELSIACSP [43]. Les gîtes à *An. rufipes* sont situés dans les bas-fonds, à l'ornière du village, et sont constitués de mares permanentes à végétation dressée. La phase aquatique des anophèles peut durer, en zone tropicale, d'une à trois semaines en fonction de l'espèce et de la température. Elle est de 21 jours pour *An. rufipes*.

Ainsi depuis le rôle épidémiologique d'*An. rufipes* rapporté par Holstein, dans la zone de Soumoussou, aucune autre étude n'a évoqué son rôle de vecteur à part celle de [43].

II. OBJECTIFS

II.1. Objectif général

Dans un contexte de changement global qui voit notamment l'urbanisation galopante de Soumoussou et afin de susciter si nécessaire son implication dans les campagnes futures de lutte, il s'avère nécessaire de réactualiser le rôle de vecteur potentiel d'*An. rufipes* dans la transmission de *Plasmodium falciparum* à Soumoussou afin de susciter, si nécessaire, l'intérêt à son propos dans les futures des campagnes de lutte.

II.2. Objectifs spécifiques

Ainsi, nous avons mené une approche résolument comparative entre les différentes espèces trouvées à Soumousso, à savoir *An. gambiae s.l.*, *An. funestus* et *An. rufipes*, afin de façon spécifique de :

- déterminer la densité des populations anophéliennes selon la période et le type d'habitat ;
- comparer l'index d'antropophilie (I.A) des femelles collectées sur le terrain ;
- comparer la longévité d'*An rufipes* à celle des vecteurs majeurs comme *An coluzzii* ;
- évaluer l'indice sporozoïtique sur le terrain;
- évaluer, au laboratoire, la susceptibilité des moustiques de terrain à l'infection par *Plasmodium falciparum*.

III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Suivi de la densité d'*Anopheles rufipes* et d'*Anopheles gambiae* s.l. au cours du temps et présence de *Plasmodium falciparum*

III.1.1. Description du site d'étude

Notre étude a eu lieu dans le village de Soumousso ($11^{\circ}00'46''N$, $4^{\circ}02'45''W$) situé à environ 55 Km à l'Est de Bobo-Dioulasso, deuxième grande ville du Burkina Faso (Sud-ouest du pays). C'est un village situé dans une zone de savane de type guinéen où la saison des pluies dure de Mai à Octobre avec une pluviométrie de 1000 à 1200mm d'eau. Soumousso compte six quartiers dont 3 ont été choisis pour notre étude: Dioulabougou, Lafiabougou et Bagui. Dioulabougou est situé à l'est de Soumousso, Lafiabougou au nord tandis que Bagui est situé au sud-est (**Figure 2**). Avec une population de 8800 habitants, les concessions sont faites en majeure partie avec du Banco et plus rarement avec du ciment. Elles sont couvertes de toit en paille ou d'aluminium. En 2009, quatre principaux vecteurs de *Plasmodium* étaient présents dans ce village: *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. nili* [16]. La présence d'*An. arabiensis* a été signalée de manière occasionnelle mais à une faible proportion (< à 5% des échantillons d'*An. gambiae* s.l.). *An. rufipes* est présent en fin de saison des pluies [43]. Les gîtes larvaires d'*An. gambiae* s.l. sont principalement constitués de collections d'eau de pluie à l'ornière des routes, de trous réalisés pour le prélèvement du banco pour les constructions des maisons, et de traces de sabots de bétail à la bordure des mares. Les gîtes à *An. rufipes* sont situés dans les bas-fonds, à l'ornière du village, et sont constitués de mares permanentes à végétation dressée. Nous avons choisi d'effectuer notre étude dans le même site que Da *et al.*, 2013, étant donné le succès des auteurs à collecter *An. rufipes* infecté. Nous avons également voulu tirer profit du fait que les habitants de Soumousso sont familiers du travail et de la présence des entomologistes du centre Muraz/IRSS dans leur village, et que certains peuvent pratiquer les collectes entomologiques.

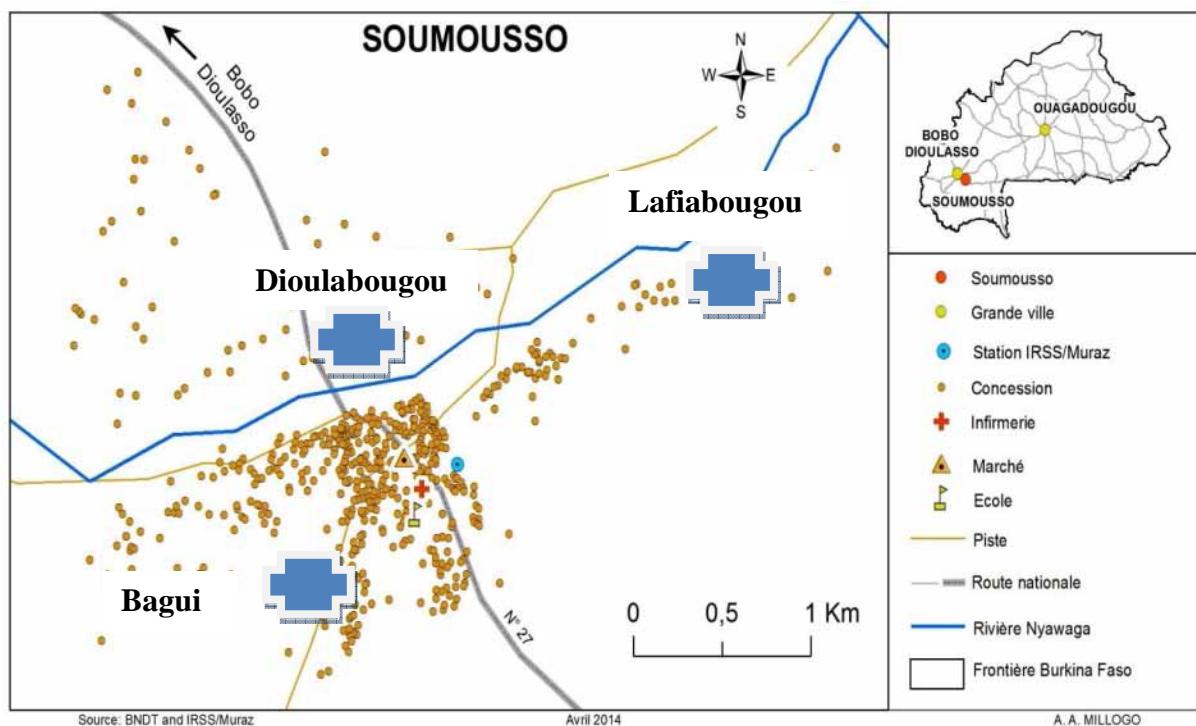


Figure 2: Cartographie du site d'étude.

III.1.2 Echantillonnage

La capture des moustiques adultes a été effectuée durant 4 jours consécutifs de chaque mois sur une période de 4 mois (septembre à décembre 2013) dans les quartiers de Lafiabougou, Dioulabougou, Bagui. Pour chaque quartier, 3 maisons habitées et 3 maisons non habitées ont été choisies au hasard. La collecte des moustiques au repos a été réalisée par la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides à base de bombes aérosols « KALTOX » constituées de pyréthrinoides. Des draps ont été étalés dans la chambre afin de recouvrir tout le plancher puis deux agents ont pulvérisé simultanément, l'un à l'intérieur, l'autre à l'extérieur sur les issues, portes et fenêtres par lesquelles les moustiques pourraient éventuellement s'échapper. Après une dizaine de minutes d'attente, les draps ont été soigneusement sortis puis les moustiques récupérés et placés dans des boîtes portant des indications sur le lieu, la date de collecte, le numéro de la concession et de la maison. Ces séances ont été réalisées dans les localités prospectées entre 7h et 9h. L'identification morphologique des moustiques a été effectuée en utilisant les clés d'identification de Gillies et De Meillon, (1968,1987) [44], les femelles d'*An. gambiae* s.l et d'*An. rufipes* ont été conservées dans des boîtes de Pétri contenant du coton imbibé d'eau sur lesquels étaient enregistrés la date, le nom du quartier, le numéro de la concession et de la maison. Une fiche de collecte enregistrait les informations concernant les

moustiques telles le genre, le sexe, le nombre pour chaque maison, la date, le quartier et la nature de la maison (habitée ou non habitée) et l'état physiologique des femelles (gorgées, gravides, semi-gravides, à jeûn). Les échantillons ont été acheminés au laboratoire de l'IRSS/DRO et conservés au congélateur à -20 C en attendant leur analyse moléculaire (PCR et ELISA).

III.1.3. Identification des moustiques

Les identifications des espèces se sont effectuées sous la loupe binoculaire au grossissement ×20 ou ×40 (**Tableau I**).

Tableau I : Tableau comparatif montrant les caractères morphologiques différentiels des femelles adultes d'*An. gambiae s.l*, d'*An. funestus* et d'*An. rufipes*

	<i>An. gambiae. s.l</i>	<i>An. funestus</i>	<i>An. rufipes</i>
Palpes	3(parfois 4) bandes pâles, l'apicale beaucoup plus développée que les autres	3(parfois 4) bandes pâles très étroites	3(parfois 4) bandes pâles
Ailes	Cinq tâches pâles sur la costa dont deux basales ;	Quatre tâches pâles sur la costa avec le quart basal entièrement noir	Cinq tâches pâles sur la costa
Abdomen			Translucide pour les femelles gorgées
	-antérieur largement annelé de pâle aux articulations	Postérieur, entièrement noir	postérieur : I et II, bande pâle à l'apex
Tarse	-postérieur étroitement (mais non toujours) annelé de pâle aux articulations	III : bande pâle apicale plus petite que la moitié de l'article IV et V : entièrement pâles	III : bande pâle apicale plus petite que la moitié de l'article IV et V : entièrement pâles

III.1.3.1. Identification morphologique d'*An. rufipes*

Le troisième article de cette espèce au niveau du tarse postérieur possède une bande noire plus grande que la moitié de l'article. Deux petites bandes tachetées sont sous la Costa de l'aile. Les palpes montrent deux bandes tachetées larges à l'apex contre une bande tachetée étroite.

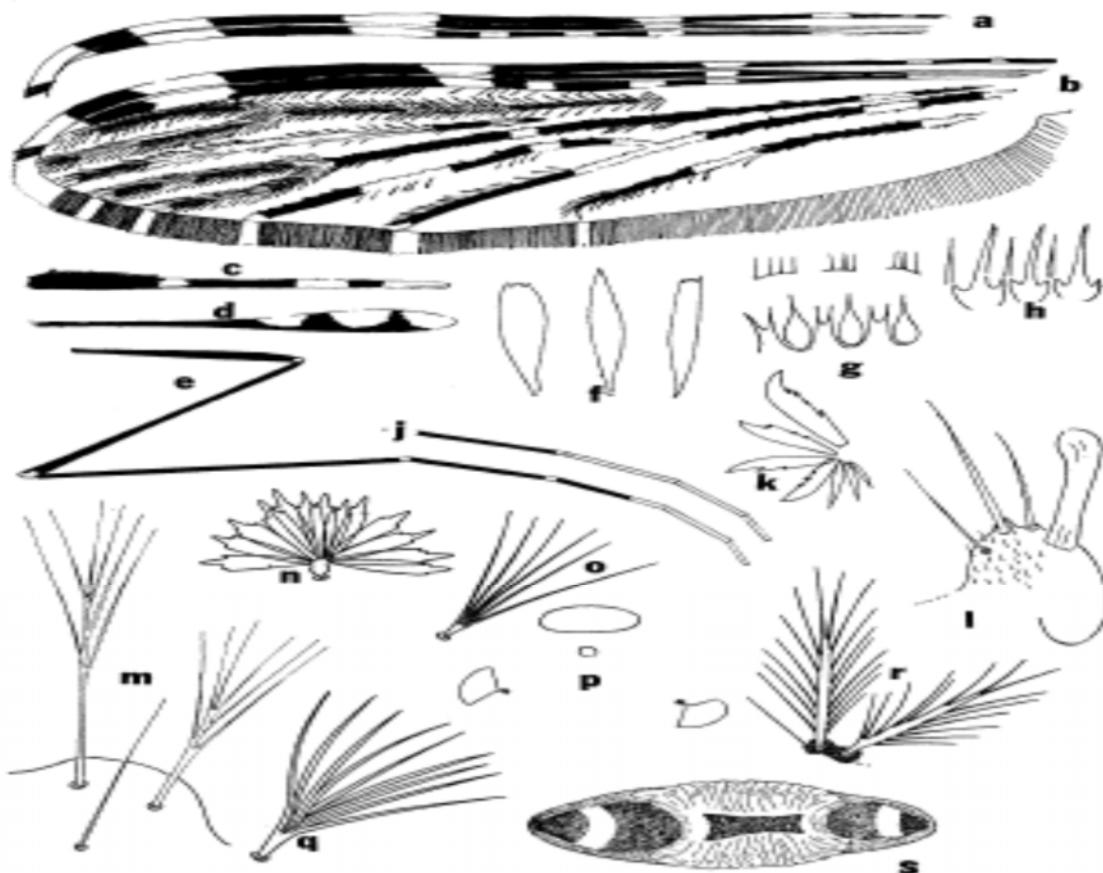


Figure 3 : Illustration des caractères morphologiques d'*An. rufipes*

Légende : **a-** côte ailé de la femelle d'*An. rufipes*; **b-** aile de la femelle; **c-** palpe de la femelle ; **d-** palpe du mâle ; **e-** patte postérieure de la femelle ; **f-** écailles du mésoténum de la femelle; **g-vue dorsale** du pharynx de la femelle ; **h-** vue ventrale du pharynx ; **i-vue** d'un cône du pharynx ; **J-tarse** postérieure montrant les variations ; **k-** phallosome dépliant du mâle ; **l-** harpago du mâle ; **m-larve** munie de poils ; **n-poils** palmés entièrement développés dans l'abdomen de la larve ; **o-** premier segment abdominal muni de poils palmés, larve ; **p-** cinquième segment abdominal, larve ; **q-** deuxième segment abdominal muni de poils palmés ; **r-poils** palmés de la larve ; **S-œuf**

III.1.3.2. Identification morphologique d'*An. gambiae s.l*

Il possède des tarses antérieurs annelés ou non de pale aux articulations et présente une large bande tachetée à l'apex au niveau des palpes chez la femelle, avec un abdomen couvert d'écailles.

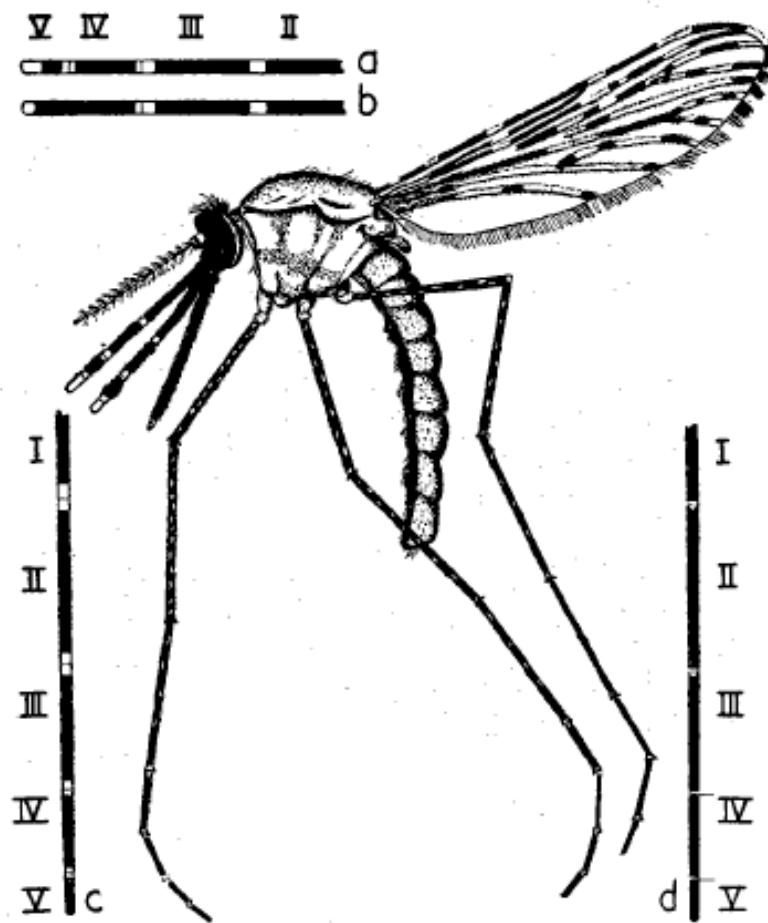


Figure 4: Illustration des caractères morphologiques d'*An. gambiae* s.l.

a. forme typique du palpe avec 4 bandes pales; b. trois bandes pales du palpe, anormales avec une bande pale apicale plus petite ; c. segments du tarse antérieur; d. segments du tarse postérieur;

III.1.3.3. Identification morphologique d'*An. funestus*

Plus petits qu'*An gambiae* s.l et *An rufipes*, ces anophèles présentent des tarses postérieurs entièrement sombres ; les femelles gorgées possèdent un abdomen translucide avec des palpes comprenant deux bandes larges à l'apex et une bande étroite. Au niveau des ailes, la base de la première nervure est pale.

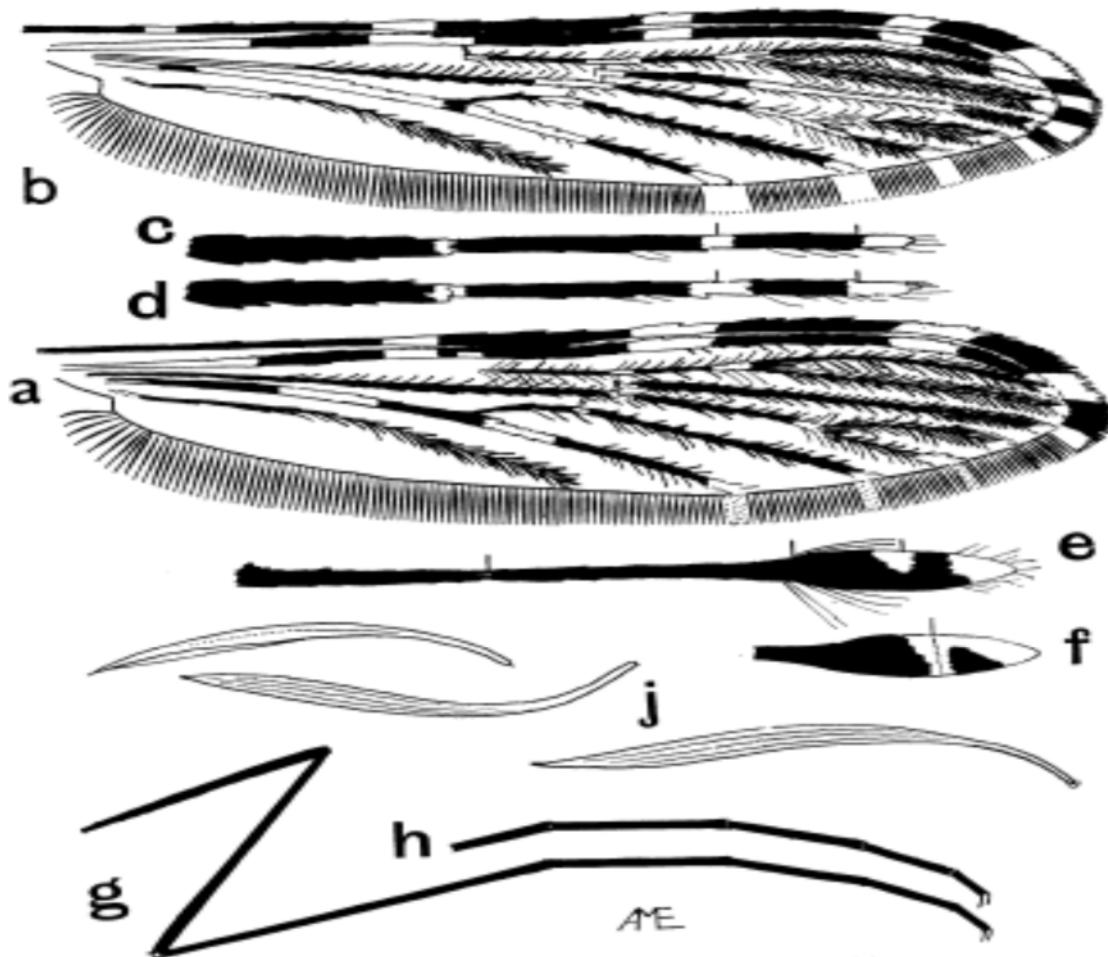


Figure 5: Illustration des caractères morphologiques d'*An funestus*

a et b : ailes de la femelle montrant des variations ; c et d : palpes de la femelle avec des variations ; e et f : palpes du mâle montrant des variations ; g et h : pattes postérieures avec des variations ; j : écailles du mésoténum

III.1.4. Extraction de l'ADN génomique

Nous avons utilisé les têtes- thorax et/ou les pattes des moustiques pour l'extraction de l'ADN génomique selon le protocole du Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide (CTAB) 2%

(Annexe 1).

III.1.5. PCR-ITS-2rDNA pour l'identification des espèces au sein du genre d'*Anopheles*

Certains moustiques issus des collectes et ayant perdu des ailes ou pattes n'ont pu être déterminés comme étant des *An gambiae s.l.*, *An rufipes* ou *An funestus* par des clefs

d'identification (ailes ou pattes absentes). Pour ceux-ci nous avons réalisé une PCR utilisant des amores ciblant la région ITS (Internal transcribed sequence 2) du gène codant pour l'ADN ribosomal (ADNr), polymorphe entre les différentes espèces étudiées (**Annexe 2**). Deux microlitres (2 µl) de l'ADN dilué au 1/10 est combiné dans un volume final de 20 µl avec les amores ITS2A et ITS2B, des dNTPs, du MgCl₂, du tampon, de l'eau ultra-pure et de la Taq polymérase. Les conditions de la PCR sont: dénaturation à 94°C pendant 5 mn, suivie de 35cycles composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, d'hybridation à 55°C pendant 1mn30s et d'extension à 72°C pendant 60s. La dernière étape d'extension est prolongée par un maintien à 72°C pendant 10mn. 12µl du produit amplifié ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% sous une tension de 150 mV pendant 45mn et visualisés sous UV pour la détermination de la taille des produits de PCR. Les contrôles positifs étaient constitués d'ADN de moustiques formellement identifiés par les méthodes morphologiques. Les moustiques appartenant au genre *An. gambiae* s.l sont déterminés par une taille de fragment de 600 pb et ceux de l'espèce *An. rufipes* par un fragment de 550 pb (**Annexe 2**).

III.1.6. PCR d'identification des espèces au sein du complexe *An. gambiae* s.l

L'identification des espèces au sein du complexe *An. gambiae* s.l (*i.e* identification des espèces *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*) a été effectuée par PCR SINE 200X6.1LOCUS selon le protocole de Santolamazza et al., 2008[45] (**Annexe 2**). Deux microlitres (2µl) d'ADN dilué au 1/10 sont combinés dans un volume total de 20µl avec les amores SINE 200X.6.1.F et SINE 200X.6.1.R, des dNTPs, du MgCl₂, du tampon, de l'eau ultra pure et de la Taq polymérase. Cette PCR cible un polymorphisme au niveau de l'insertion d'un retrotransposon. Les conditions de la PCR sont : dénaturation à 94°C pendant 10 mn, suivie de 35cycles composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, d'hybridation à 54°C pendant 30s et d'extension à 72°C pendant 60s. La dernière étape d'extension est prolongée par un maintien à 72°C pendant 10mn. 12µl du produit amplifié ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% sous une tension de 150 mV pendant 45mn et visualisés sous UV pour la détermination des produits de la PCR. Les contrôles positifs étaient constitués d'ADN de moustiques d'*An. coluzzii*, d'*An. gambiae* et d'*An. Arabiensis* issus des colonies disponibles à l'insectarium de l'IRSS/DRO. Les tailles attendues étaient de 479 pb pour *An. coluzzii* contre 249 pb pour *An. gambiae* Giles et 223 pb pour *An. arabiensis*.

III.1.7. PCR diagnostique de l'infection du moustique par *Plasmodium falciparum*

La recherche des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* a été faite sur l'ADN extrait des tête-thorax. Elle a été réalisée selon le protocole de PCR-*Pf* (**Annexe 2**). Cette PCR cible le gène codant pour la protéine circonsporozoïtes (reference) spécifique du parasite. Deux microlites (2µl) de l'ADN dilué au 1/10 sont combiné dans un volume final de 20 µl avec les amores P.f.F (P1) et P.f.R (P2), des dNTPs, du MgCl₂, du tampon, de l'eau ultrapure et de la Taq polymérase. Les conditions de la PCR sont : dénaturation à 94°C pendant 5 mn, suivie de 35cycles composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, d'hybridation à 56°C pendant 1mn30s et d'extension à 68°C pendant 60s. La dernière étape d'extension est prolongée par un maintien à 68°C pendant 10mn. 12µl du produit amplifié ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% sous une tension de 150 mV pendant 45mn et visualisés sous UV pour la détermination des produits de la PCR. Les contrôles positifs étaient constitués d'ADN de *Pf*. La taille du fragment amplifié par la PCR était de 501 pb.

III.1.8. Tests ELISA pour l'identification de l'origine du repas sanguin des moustiques gorgés

La détermination de l'origine du repas sanguin des anophèles était basée sur la technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay) directe de [46] légèrement améliorée par Didier Fontenille (1998). Cette technique consiste à mettre en évidence la présence de l'immunoglobuline G de l'espèce hôte (dont le sang est présent dans l'estomac du moustique) à l'aide d'anticorps anti IgG espèce-spécifiques couplés à une peroxydase (**Annexe 3**). Une réaction positive (c'est-à-dire la formation d'un couple IgG-Anti-IgG) est détectée grâce à l'activité de la peroxydase qui forme un précipité bleu en présence de son substrat. Les hôtes potentiels des différentes espèces d'anophèles considérées ont été choisis en tenant compte de leur forte présence dans le village de Soumousso. Ainsi huit (08) anticorps anti-IgG espèce-spécifique marqués à la peroxydase ont été utilisés pour l'analyse : anticorps anti-IgG d'homme, de bœuf, de mouton, de chèvre, d'oiseau/poule, de porc, de chien et de cheval/âne. Cette analyse immunologique a été effectuée sur toutes les femelles d'*An.rufipes* gorgés au nombre de 86 en comparaison à toutes les femelles d'*An*

gambiae s.l gorgées avec un effectif de 415 collectées à Soumoussou par la pulvérisation intra-domiciliaire (PID).

III.2. Etudes en laboratoire: longévité et infections expérimentales.

III.2.1. Elevage des moustiques

En parallèle des aspersions intra-domiciliaires de pyrethrinoïdes, nous avons capturé des femelles gorgées ou gravides par aspiration de la faune résiduelle à l'intérieur des maisons de Soumoussou. Les femelles ont été mises en cage et ramenées au laboratoire de l'IRSS/DRO pour leur identification morphologique à partir des clés d'identification de [44]. Les moustiques capturés ont été maintenus à l'insectarium pendant 2 à 3 jours afin que les femelles gorgées forment leurs oeufs. Chaque femelle a été isolée dans un gobelet de plastique couvert d'un tulle moustiquaire contenant de l'eau afin de stimuler la ponte. Les femelles du complexe *An. gambiae s.l* ayant pondus ont été conservées dans des tubes de 1.5 mL contenant de l'éthanol à 70° jusqu'à leur identification moléculaire. Après identification moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae s.l* ayant pondus, les larves d'*An. coluzzii* et d'*An. rufipes* ont été distribuées dans des bacs rectangulaires de 28 cm de long et de 18 cm large, remplis d'eau de robinet (1000 mL). Chaque bac contenait 150 larves en moyenne et était recouvert d'un tulle moustiquaire de maille d'environ 0,2 mm. L'élevage en routine des moustiques a été réalisé selon les conditions standard de l'insectarium : 27± 2 °C, 70±5% d'humidité relative et une photopériode de 12L: 12D. Les larves ont été nourries avec une quantité de 0,2mg/larve de Tetramin® Baby fish-food. À la nymphose, celles-ci ont été triées chaque jour et placées dans des gobelets contenant de l'eau de robinet puis mises dans une cage. Cet élevage a permis de réaliser les tests de survie des adultes d'*An. coluzzii* et d'*An. rufipes* ainsi que les expériences en infections expérimentales de ces deux espèces.

III.2.2. Longévité

Dans cette expérience 3 lots de moustiques indépendants (*i.e.* issus d'un élevage différent) ont été utilisés pour déterminer la longévité des femelles d'*An. coluzzii* et d'*An. rufipes*. Trente (30) à 40 moustiques par espèce et par lot étaient disposés dans des gobelets en carton recouverts de tulle moustiquaire et placés dans les conditions standard de l'insectarium précédemment décrites. Sur le tulle moustiquaire était déposé du coton imbibé d'une solution de glucose (5%) *ad libitum* sur lequel se nourrissaient les femelles. Une fiche de longévité a été élaborée pour chaque lot afin de reporter de façon quotidienne la mortalité.

III.2.3. Infections expérimentales

III.2.3.1 Principe

Couramment appelée « Direct Membrane Feeding Assays » [19], cette technique consiste à faire gorger des moustiques sur du sang provenant des patients naturellement infectés, porteurs de gamétocytes. Ce sang est contenu dans des cellules de gorgement ou « feeders ». La base de chaque cellule de gorgement est préalablement recouverte d'une membrane de parafilm à travers laquelle les moustiques vont prendre leur repas de sang. Ce dispositif est maintenu à 37°C par un bain thermostaté car toute baisse de température, en dessous de la température corporelle aurait causé une ex-flagellation des gamétocytes les rendant moins viables chez le moustique.

III.2.3.2 Enquêtes parasitologiques: recherche de porteurs de gamétocytes

Des prospections parasitologiques ont été menées dans les localités de Kleeso, Dandé et Soumoussou, 3 villages environnant la ville de Bobo-Dioulasso. Des gouttes épaisses ont été réalisées chez des volontaires âgés de 5 à 12 ans. Ces derniers ont été inclus dans l'étude lorsqu'ils remplissaient les conditions suivantes : absence de signes cliniques, être âgé de 5 à 12 ans, résider dans les trois localités, sans distinction de sexe. Tous les enfants qui présentaient les signes cliniques du paludisme ont été conduits au Centre de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de ladite localité pour une prise en charge selon le protocole national. La goutte épaisse et le frottis ont consisté à un prélèvement de 2 ou 3 microlitres de sang capillaire au bout du doigt de chaque sujet et déposé sur une lame. Après fixation du frottis au méthanol et séchage, la goutte épaisse et le frottis ont été colorés au Giemsa 10% pendant 10 minutes puis examinés au microscope à l'objectif 100 pour la détection des stades sexués et asexués des parasites (les gamétocytes et les trophozoïtes) ainsi que pour déterminer l'espèce de *Plasmodium*. Une double lecture a été effectuée pour confirmer les lames positives aux gamétocytes. Les patients porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* ont été emmenés le lendemain au laboratoire (IRSS) pour le prélèvement sanguin (**Figure 6**).

III.2.3.3. Réalisation des infections expérimentales

Les séries d'infection expérimentale au nombre de quatre dont trois de Soumoussou et une d'Oursi, ont été effectuées par gorgement des moustiques sur les membranes de Parafilm®. Deux tubes héparinés de 5 ml de sang de porteurs de gamétocytes ont été centrifugés

immédiatement après le prélèvement à 3000 rotations par minutes (rpm) pendant 3 mn à 37°C. Le plasma a été remplacé par une quantité équivalente de plasma d'un sujet naïf afin d'éviter la réponse immunitaire du sujet porteur. Une partie des femelles élevées précédemment ont séjourné après émergence dans des cages communes avec les mâles pendant au moins 3 jours dans le but de permettre la maturation de leurs organes sexuels et de favoriser leur accouplement. Quatre infections expérimentales ont été réalisées pendant mon stage. Pour chaque infection, deux gobelets contenant un nombre déterminé de moustiques ont été utilisés pour chaque espèce d'anophèles (*An. coluzzii* vs *An. rufipes*). Les moustiques ont été mis en contact avec le sang à travers la membrane de Parafilm®, et placés dans l'obscurité pendant une trentaine de minutes. Les femelles gorgées ont été ensuite triées et mises en cage au laboratoire dans les conditions standard d'élevage jusqu'au quatorzième jour après infection (J14 post infection), date à laquelle la forme infectante du parasite se retrouve dans les glandes salivaires du moustique. Pendant toute la durée de l'expérience les femelles gorgées ont été nourries de solution de glucose (5%) (**Figure 6**).



Figure 6: Schéma du protocole de prospection parasitologique et dispositif d'infection expérimentale

(Source : photo de Camille Jacqueline et David Colwell).

III.2.3.4 Les considérations éthiques

Notre étude a été examinée et approuvée par le comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ pour le projet EMMA de Thierry Lefèvre avec lequel nous avons travaillé en parallèle. Les personnes concernées ont été mises au courant lors d'une séance de sensibilisation avant le début de l'étude. Une traduction en langue locale du protocole (dioula, mooré), si nécessaire, a été effectuée afin que les intéressés adhèrent ou pas à l'étude. Tous les individus enrôlés, ont participé au travail après signature du consentement éclairé par leurs parents ou par leurs tuteurs légaux. Pour les enfants présentant des symptômes et/ou ayant une parasitémie supérieure à 1 000 parasites / μ l, ils ont été conduits au dispensaire et traités selon le protocole national.

III.3. Les analyses statistiques et le traitement des données

Les données obtenues ont été saisies avec le logiciel Excel Microsoft version 2007. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du Logiciel R 2.14.0 GUI 1.42. Les données correspondant au nombre de moustiques dans les maisons ont été analysées à l'aide de modèles de régressions linéaires (GLM (Generalized linear model), distribution des erreurs suivant la loi de quasi poisson). Les variables explicatives sont la période d'échantillonnage (variable discrète à 4 niveaux), l'espèce (variable discrète à 3 niveaux), le quartier (variable discrète à 3 niveaux) et le type de maison (variable discrète à 2 niveaux). Afin d'identifier des différences entre chacun des niveaux des variables « période », « espèce » et « quartier », nous avons utilisé, lorsque nécessaire, des tests « post-hoc » de comparaisons multiples à l'aide de la fonction *glht* du package **multcomp** [47]. Les données relatives aux repas de sang ont également été analysées à l'aide d'un GLM (distribution des erreurs suivant une loi binomiale). A cause de la répartition non aléatoire des réactions négatives entre les sessions d'échantillonnage, nous ne pouvons analyser nos échantillons que par rapport à l'effet « espèce » et « type de maison ». L'indice d'anthropophilie (proportion de moustiques s'étant gorgée sur l'homme) a été comparé entre espèces et en fonction du type de maison. Nous avons ainsi étudié l'effet des variables « période », « quartier », « espèce » et « type de maison » sur le nombre total de moustiques gorgés et le nombre de moustiques ayant pris un repas de sang humain vs sang animal. Des modèles non paramétriques de régression ont été utilisés pour analyser les données de survie (Cox proportional hazard models, fonction coxph dans le logiciel R). La distribution des survies chez les deux espèces ont été illustrées par les

courbes de Kaplan-Meier. Enfin, les données d'infections expérimentales (*i.e.* présence ou absence de sporozoïtes dans les glandes salivaires des moustiques exposés) ont également été analysées à l'aide d'un GLM (distribution des erreurs suivant une loi binomiale). Les tests statistiques ont été utilisés pour comparer les variables avec un niveau de significativité de 5% ($P<0.05$).

IV. RESULTATS

IV.1. Collecte d'anophèles à Soumoussou

IV.1.1. Effet de la période d'échantillonnage, du type de maison et du quartier sur le nombre de moustiques collectés

Un total de n=939 anophèles femelles a pu être capturées et identifiées pendant notre étude à Soumoussou, parmi lesquelles 80% étaient des femelles appartenant au complexe *An. gambiae s.l.*, 9% étaient des *An. funestus*, et 11% des *An. rufipes*. Seuls 3 *An. flavicosta* (exclusivement dans des maisons non habitées en septembre et octobre), 1 *An. coustani* (dans une maison habitée en octobre) et 1 *An. nili* (dans une maison non habitée en octobre) ont pu être collectés pendant la durée de notre étude. Nous avons écarté ces espèces de nos analyses à cause du faible effectif qu'elles représentaient. Au sein du complexe *An. gambiae s.l.*, *An. gambiae* représente 65% des captures alors que *An. coluzzii* et *An. arabiensis* ne représentent que 30 et 5% des captures, respectivement. A cause de problèmes de réactions PCR de détermination des espèces au sein du complexe *An. gambiae s.l.*, nos données sont malheureusement inexploitables au niveau intra-complexe.

Pour *An. gambiae s.l.* comme pour *An. funestus* et *An. rufipes*, la période d'échantillonnage influence significativement le nombre de moustiques collectés par maison (GLM, quasi poisson, $P<0,001$ pour les 3 espèces, **Figure 7**). Ainsi, la proportion d'*An. gambiae s.l* capturée dans les maisons diminue au cours du temps (tendance marginalement significative, GLM, quasi poisson, $p=0.06$, **Figure 8**) alors que celles d'*An. funestus* et d'*An. rufipes* augmentent significativement (GLM, quasi poisson, $P<0.01$, $P<0,001$, respectivement, Fig.8). Alors que pour *An. gambiae s.l.* le type de maison (habitée ou non habitée) n'a aucune influence sur le nombre de moustiques collectés (GLM, quasi poisson, $P>0.05$), cette variable influence significativement le nombre d'*An. funestus* et d'*An. rufipes* capturés quel que soit le mois considéré (GLM, quasi poisson, $P<0.001$ pour les deux espèces, interaction période × type de maison non significative ($P>0.05$ et $P>0.05$ pour *An. funestus* et *An. rufipes*, respectivement), **Figure 7**). Alors que le quartier échantillonné n'influence pas le nombre de moustiques capturés chez *An. gambiae* et *An. funestus* (données non montrées, GLM, quasi poisson, $P>0.05$ et $P>0.05$, respectivement), le nombre d'*Anopheles rufipes* collectés à Bagui est plus important qu'ailleurs ($n=2.00\pm0.20$ à Bagui, $n=0.37\pm0.05$ à Dioulabougou et $n=0.72\pm0.10$ à Lafiabougou, « effet quartier » : GLM, quasi poisson, $P<0.05$).

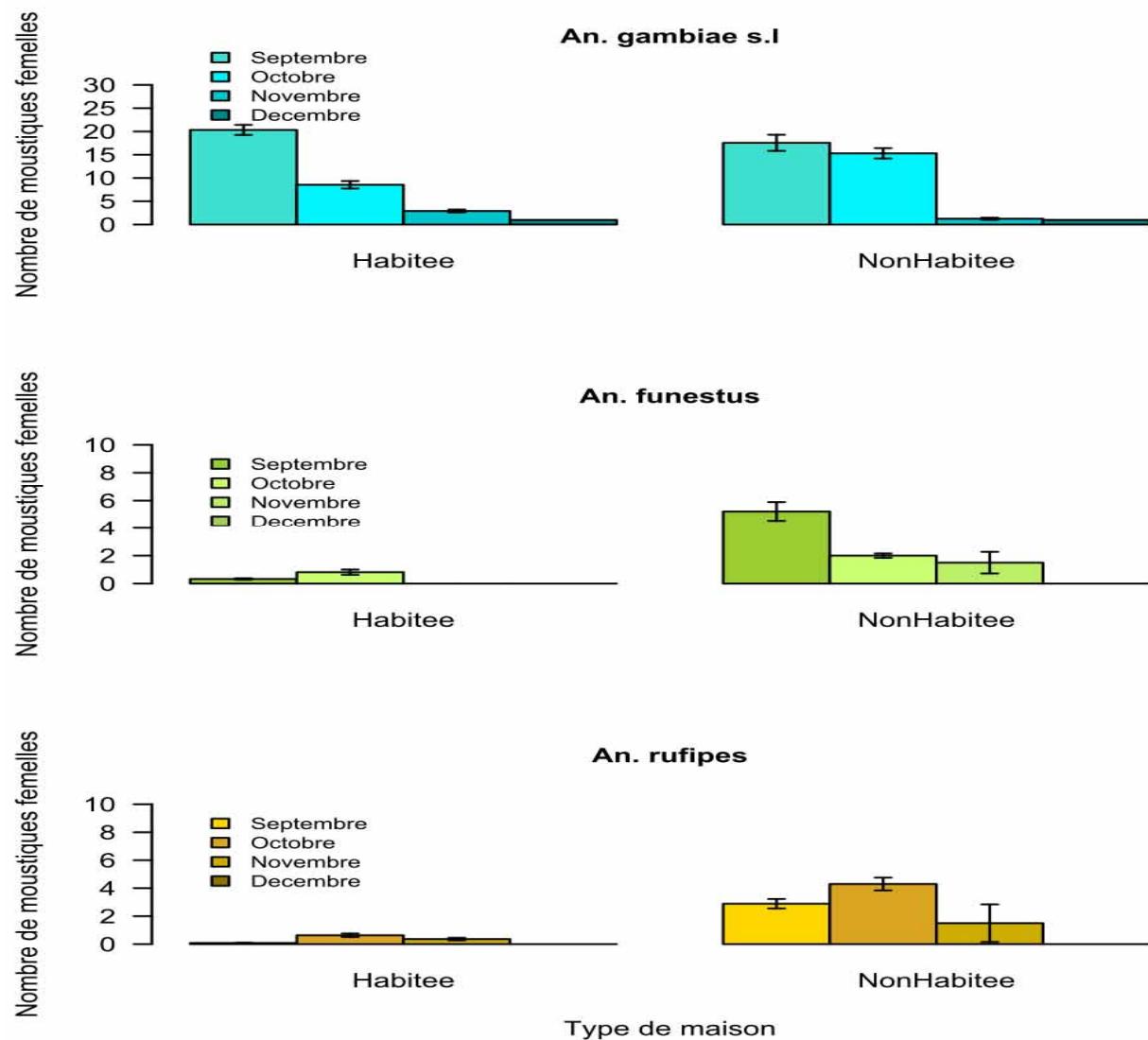


Figure 7: Effet de la période, du type de maison sur la densité des femelles *An gambiae s.l.*, *An funestus* et *An rufipes* collectées à Soumousso

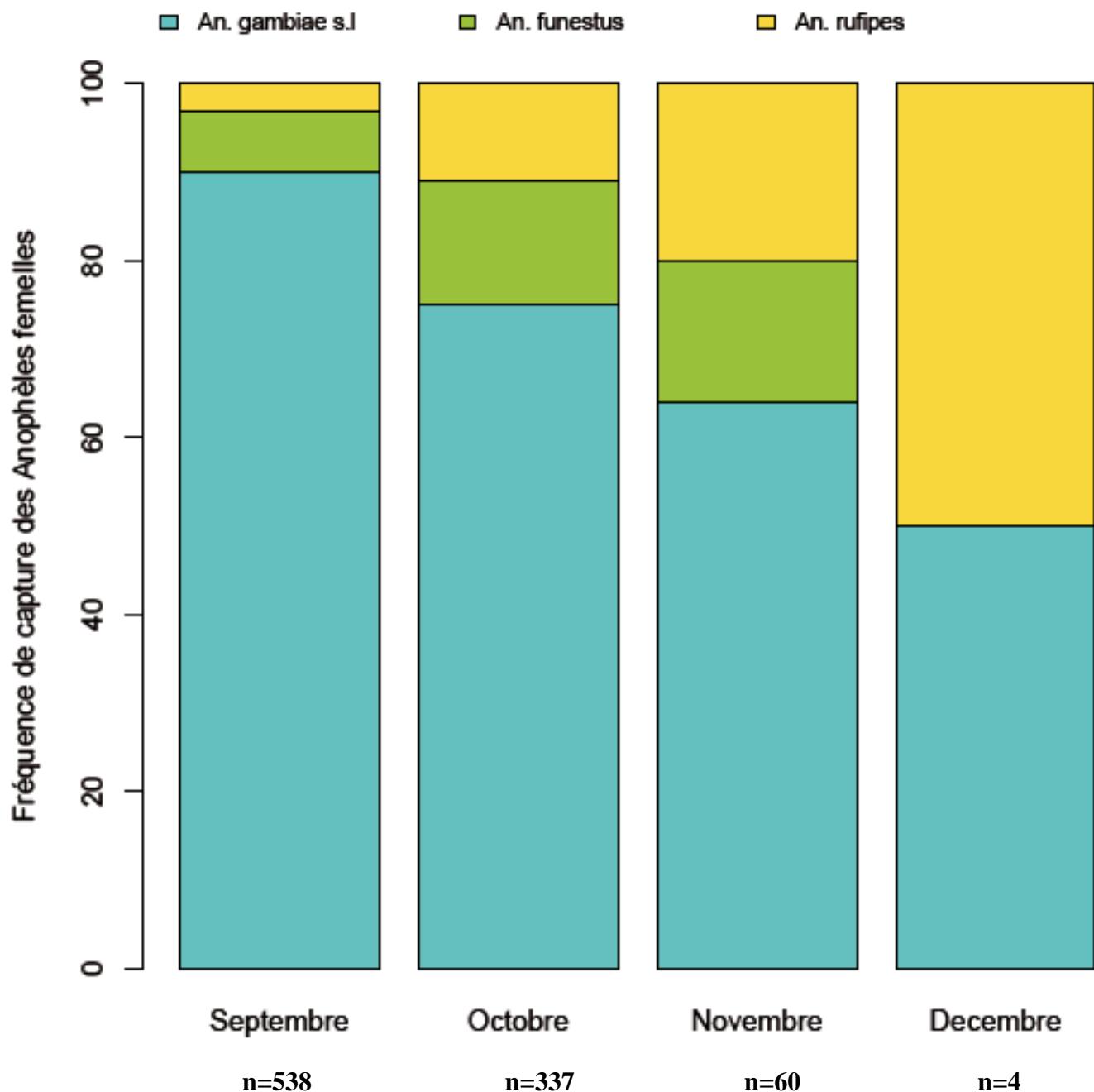


Figure 8: Effet de la période sur la densité des femelles *An gambiae s.l.*, *An funestus* et *An rufipes* collectées à Soumousso

IV.1.2. Effet de l'espèce, de la période de collecte, du type de maison et du quartier sur le taux de gorgement

An. rufipes est l'espèce trouvée la plus gorgée de sang lors de nos collectes (GLM, quasi poisson, effet espèce, $P<0,001$, **Figure 9**) suivie d'*An. funestus* et des espèces du complexe *An. gambiae s.l.*. La proportion de moustiques gorgés est identique entre maisons habitées et

non habitées pour *An. rufipes*, mais diffère pour *An. funestus* et *An. gambiae s.l.* qui montrent des tendances inversées : plus d'individus sont gorgés dans les maisons non habitées chez *An. funestus* alors qu'au contraire plus d'individus sont gorgés dans les maisons habitées chez *An. gambiae s.l.*

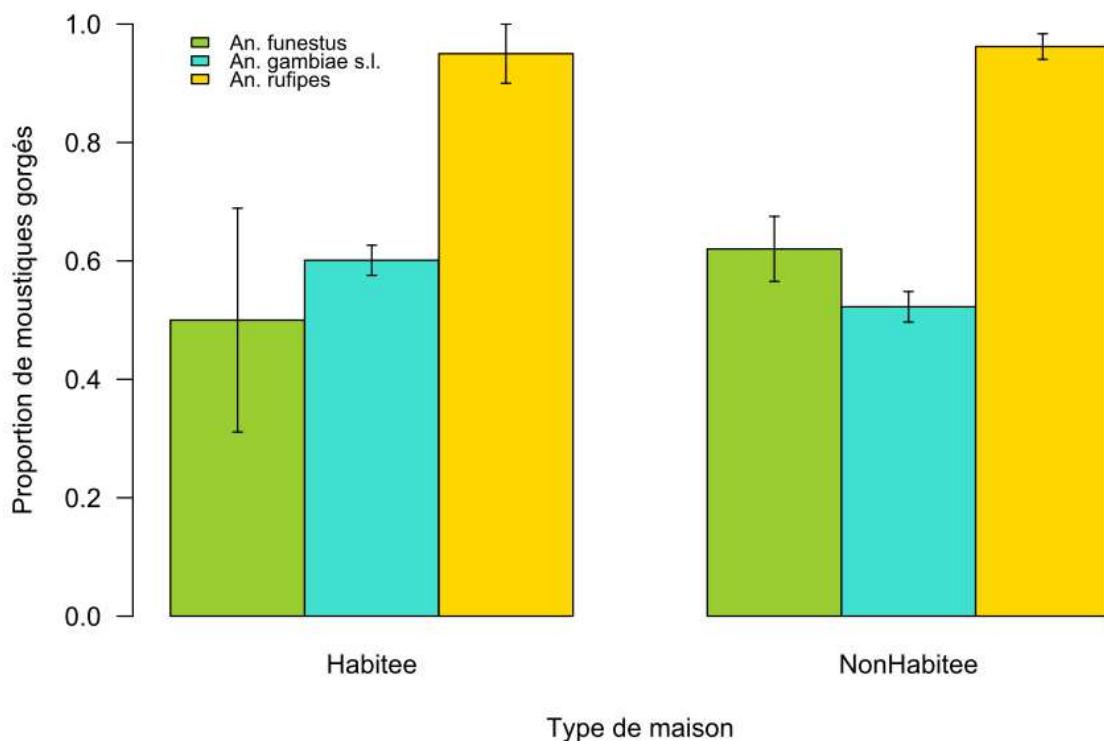


Figure 9: Effets de l'espèce et du type de maison sur le taux de gorgement des moustiques

IV.2. Infection par *Plasmodium falciparum* des anophèles collectés

En raison des problèmes de PCRs évoqués plus haut qui ont surtout atteint les échantillons d'octobre, nous ne pouvons faire d'analyses pour ce qui concerne la prévalence de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae s.l.* en fonction des différentes variables étudiées. Cependant, nous pouvons noter que les moustiques trouvés porteurs de sporozoïtes ($n=6$) appartenaient exclusivement à l'espèce *An. gambiae* du complexe *An. gambiae s.l.* et avaient été majoritairement capturés dans des maisons habitées. ($n=5$). Devant la répartition non aléatoire du nombre de PCRs négatives, nous ne pouvons en toute rigueur pas effectuer de tests statistiques. Cependant aucun *An. rufipes* n'a été trouvé infecté de sporozoïtes sur le terrain (0/89).

IV.3. Tests ELISA pour l'origine du repas de sang des moustiques gorgés

Nous avons réalisé les expériences d'ELISA sur *An. gambiae s.l.* et *An. rufipes* seulement. Les moustiques identifiés comme étant *An. funestus* ayant fait l'objet d'une étude à part menée par un autre étudiant. Au total, 415 femelles d'*An gambiae s.l.* ont été analysées contre 86 pour *An rufipes*. Une grande variété d'hôtes a pu être mise en évidence : des réactions ELISA positives ont pu être obtenues en utilisant des anticorps anti-IgG d'homme, de bœuf, de chèvre, de chien, de cheval/âne et de porc (voir Tableau II). Seules les réactions utilisant des anti-corps anti IgG de mouton et d'oiseau (données non montrées) ont donné des résultats négatifs. Le taux de gorgement sur l'homme (=indice d'antropophilie, IA) diffère significativement entre *An. rufipes* et *An. gambiae s.l.* (effet « espèce » GLM, binomial, LRT $\chi^2_1=52.012, P<0.001$, Tableau I). Ainsi, la probabilité qu'*An. gambiae* prenne son repas de sang sur un homme est environ 9 fois supérieure à celle d'*An. rufipes* (OR=8.68, 95% confidence interval [CI]= [1.69 ; 44.50], Tableau I). Pour les deux espèces, l'indice d'antropophilie diffère de manière importante entre maisons habitées et maisons non habitées (GLM, binomial, LRT $\chi^2_1=80.15, P<0.001$, OR=8.13, 95% [CI]= [4.94 ; 13.39], **Tableau II**). Les repas mixtes associant l'homme sont en majorité composés de sang d'homme et de bœuf chez les deux espèces. Tous hôtes confondus, les repas mixtes représentent un faible pourcentage sur le total des repas de sang chez *An. gambiae s.l.* (1.4 et 2.5% seulement dans les maisons habitées et non habitées, respectivement). Le nombre de repas mixtes n'associant pas l'homme est négligeable chez *An. gambiae s.l.* (0.4% des repas) alors qu'il atteint des proportions importantes pour *An. rufipes* (de 20 à 11% dans les maisons habitées et non habitées, respectivement). De manière intéressante, ces repas mixtes sont composés en majorité de sang de bovins et de caprins. Tous hôtes confondus, les repas mixtes représentent de 12 à 20% de notre effectif total chez *An. rufipes*, respectivement dans les maisons habitées et non habitées (**Tableau II**).

Tableau II : Origine des repas de sang d'*An gambiae* s.l et d'*An rufipes* gorgés des maisons habitées et non habitées de Soumoussou

<i>An gambiae</i> s.l	Mixte																						
	Humain	Bovin	Equidés	Ovin	Caprin	Porcin	Canin	H/B	H/E	H/O	H/C	H/P	H/Ca	H/OIS	B/E	B/O	B/C	B/P	B/OIS	B/ca	négatifs	Total	I.A
	H	B	E	C	C	P	Ca																
MH	136	44	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	43	227	139	
	60%	19%	0	0	0	0	0	1%	0	0	0,4%	0	0	0	0,4%	0	0	0	0	19%		76%	
MNH	32	95	8	0	0	1	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	47	188	37	
	17%	51%	4%	0	0	0,5%	0	2%	0	0	0	0	0,5%	0	0	0	0	0	0	25%		26%	
<i>An rufipes</i>	Humain	Bovin	Equidés	Ovin	Caprin	Porcin	Canin	H/B	H/E	H/O	H/C	H/P	H/Ca	H/OIS	B/E	B/O	B/C	B/P	B/OIS	O/C	négatifs	Total	I.A
	H	B	E	O	C	P	Ca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	7	15	2
	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13%	0	0	7%	47%	25%
MNH	2	36	6	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	16	71	3
	3%	51%	8%	0	3%	0	0	1,4%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11%	0	0	23%		5%

IV.5. Longévité

Trois expériences indépendantes ont été menées afin de déterminer si la longévité des femelles d'*An. rufipes* différait de celle des femelles d'*An. coluzzii*. Des effectifs de vingt, puis 36, et 40 moustiques par espèce ont été analysés au cours des réplicats 1, 2 et 3, respectivement. Tous réplicats confondus, la survie d'*An. rufipes* et *An. coluzzii* diffèrent significativement (effet Espèce, LRT $\chi^2_1= 10.245$, $P<0.001$, **Figure10**). En moyenne, *An. rufipes* vit 29.44 ± 0.63 jours contre 24.95 ± 0.64 jours pour *An. coluzzii*. L'effet « réplicat » est très hautement significatif (LRT $\chi^2_2=14.42$, $P<0.001$), ce qui démontre une variabilité importante entre les expérimentations (données non montrées). Cependant, l'interaction entre les variables « espèce » et « réplicat » n'est pas significative, ce qui signifie que l'effet « espèce » est identique entre les réplicats, autrement dit, la survie d'*An. rufipes* est supérieure à celle d'*An. coluzzii* quelle que soit l'expérience considérée (interaction espèce×réplicat, LRT $\chi^2_1=0.57$, $P>0.05$).

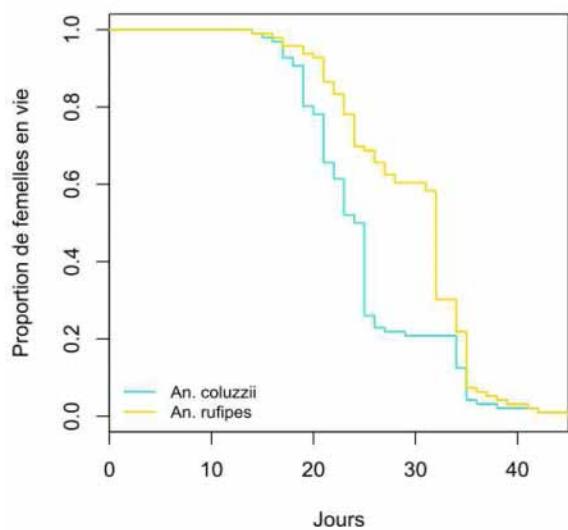


Figure 10 : Courbe de survie de Kaplan Meier des femelles d'*An. coluzzii* et d'*An. rufipes*, tous réplicats confondus

IV.6. Infections expérimentales

IV.6.1. Taux de gorgement lors des expériences

Quatre expériences indépendantes d'infections expérimentales ont été menées au cours de cette étude. De manière générale, le taux de gorgement des femelles *An. rufipes* était très inférieur à celui des femelles *An. coluzzii* (effet « espèce », GLM, binomial, $LRT\chi^2_1=60.00$, $P<0.001$). Ainsi, toutes expériences confondues, le taux de gorgement d'*An. rufipes* était de 12% contre 55% pour *An. coluzzii*. Une grande variabilité entre les expériences existe (données non montrées, effet « réplicat », GLM binomial, $LRT\chi^2_3=101.14$, $P<0.01$), mais l'interaction entre espèce et réplicat n'est pas significative (GLM binomial, $LRT\chi^2_3=0.569$, $P>0.05$). Ainsi, la différence de gorgement observée entre *An. coluzzii* et *An. rufipes* est consistante quelle que soit l'expérience considérée.

IV.6.2. Taux d'infection en sporozoïtes des femelles *An. rufipes* et d'*An. coluzzii*

L'analyse révèle que le taux d'infection en sporozoïtes à J14 après exposition à du sang infectieux diffère significativement entre *An. coluzzii* et *An. rufipes* avec un taux d'infection de 0.212 pour *An. coluzzii* (22/102) contre 0.05 pour *An. rufipes* (1/18) (effet « espèce », $LRT\chi^2_1=4.15$, $P<0.05$, **Figure 11**) et ce, quelle que soit l'expérience considérée (effet « manipe » non significatif, $LRT\chi^2_3=1.6$, $P>0.05$, interaction espèce×manipe, $LRT\chi^2_3=1.6$, $P>0.05$).

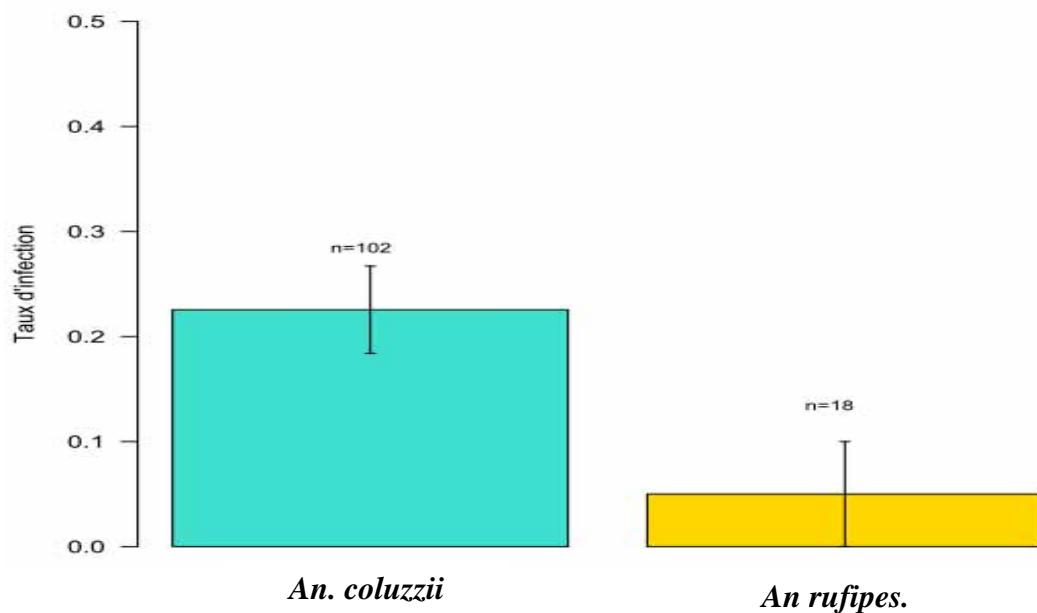


Figure 11 : Taux d'infection en sporozoïtes de *Pf* des femelles d'*An. coluzzii* et d'*An. rufipes* à J14 post-infection.

V. DISCUSSION

V.1. Bio-écologie comparative d'*An. rufipes* et *An. gambiae s.l.*

➤ Dynamique des populations et préférences trophiques à Soumoussou

Comme d'autres auteurs avant nous, nous avons observé que la proportion d'*An. rufipes* augmente avec l'arrivée de la saison sèche alors que celle d'*An. gambiae s.l.* diminue [42]. Cela peut notamment s'expliquer par la persistance des gites larvaires d'*An. rufipes*, au-delà du début de la saison sèche (*i.e.* fin octobre). A Soumoussou, ces gites sont majoritairement des mares semi-permanentes à végétation dressée qui ornent le lit de la rivière Nyawaga. Inversement, les gites favorables à *An. gambiae s.l.*, dépendant des pluies, tendent à se réduire en taille et en nombre dès la diminution en fréquence des précipitations. Seule l'espèce *An. rufipes* a une densité différente en fonction des quartiers avec, notamment, le maximum de densité trouvé dans le quartier de Bagui. D'après nos observations, les gites favorables à *An. rufipes* le long de la rivière Nyawaga sont préservés aux environs de Bagui alors qu'ils sont détruits au niveau des autres quartiers en raison de la plus forte pression anthropique qui y est observée et donc du besoin croissant en terre pour la construction des habitations. Comme d'autres auteurs avant nous l'ont montré [48], *An. rufipes* est largement zoophile, avec une préférence trophique allant vers des hôtes majoritaires et facilement accessibles comme les bovins. Cela expliquerait d'ailleurs pourquoi son taux de gorgement est si important que ce soit dans les maisons habitées et non habitées, contrairement aux autres espèces qui voient l'accès à leur hôte privilégié limité par l'utilisation massive de moustiquaires. Son indice d'antropophilie est faible mais varie en fonction du type de maison pour atteindre 25% dans les maisons habitées. *An. rufipes* est ainsi antropophage et endophile dans une proportion non négligeable, et à ce titre déjà, peut être considéré comme un vecteur potentiel de *Plasmodium falciparum*.

➤ Survie et compétence vectorielle au laboratoire

Nous n'avons trouvé aucun *An. rufipes* infecté par *Plasmodium falciparum* ce qui s'oppose aux résultats obtenus par **Da et al. 2013** et par **Holstein, 1951**, qui avaient trouvé dans la même région, 1/87 femelle infectée (au stade oocyste) [42] et 6/52 femelles infectées au stade sporozoite (après dissection des glandes salivaires). Ces résultats doivent cependant être pris avec précaution puisque ni la technique d'ELISA ni la méthode de dissection des glandes

salivaires ne permettent de déterminer si l'on est en présence de parasites transmissibles à l'homme. Nos études montrent que la survie d'*Anopheles rufipes* est compatible avec la compléction du cycle de développement extrinsèque du parasite ingéré lors d'un repas de sang infectant. En effet, dans nos conditions de laboratoire, la survie moyenne d'*An. rufipes* est même supérieure à celle d'*An. gambiae s.l.* (29 contre 24 jours, respectivement) et *An. rufipes* peut ainsi abriter le développement extrinsèque de *Plasmodium falciparum*, d'une durée comprise entre 12 et 16 jours. Cependant, les données issues de nos expériences d'infections expérimentales suggèrent qu'*An. rufipes* serait moins susceptible à l'infection par *Plasmodium falciparum* qu'*An.coluzzii*. Ce qui pourrait constituer un élément d'explication valable quant à l'absence d'*An. rufipes* infecté sur le terrain malgré sa présence dans les habitations, son taux d'anthropophilie relativement élevé dans les maisons habitées, et sa longévité.

➤ Une faune anophélien en changement

De septembre à décembre 2013, nous avons capturé des femelles anophèles parmi lesquelles 80% appartenaient au complexe *An. gambiae s.l.*, 9% étaient des *An. funestus*, et 11% des *An. rufipes*. Nous n'avons pu capturer qu'un seul *An. nili* et deux *An. Coustani*. Nos données se rapprochent de celles obtenues par **Da, et al, en 2013** (*An gambiae s.l* (58.44%), *An funestus* (29.63%) et *An rufipes*(11.93%) sur un total de 729 moustiques collectés entre Octobre et Novembre 2008), avec cependant une différence notable relative à la proportion d'*An. funestus*, nettement inférieure dans notre présente étude. Une diminution de la proportion d'*An. funestus* à Soumoussou entre les années 2000 et 2010 avait déjà été observée: lors de sessions de capture sur homme, le nombre d'*An. funestus* capturés dépassait celui d'*An. gambiae s.l.* en 2000 (*i.e.* 120 ± 15 vs 40 ± 8 entre septembre et novembre 2000, alors qu'en 2010, le nombre d'*An. funestus* capturés venant se nourrir sur l'homme était négligeable (< 1 par nuit contre 30 ± 10 *An. gambiae s.l.*). Cette diminution du nombre d'*An. funestus* à Soumoussou tendrait donc à s'accentuer au fil des années, alors que celles d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. rufipes* resteraient plus ou moins inchangées. Ceci est également valable pour *An. nili*, qui représentait un vecteur majeur du paludisme à Soumoussou en 2000-2002 encore (30% des captures sur homme) mais que nous n'avons capturé qu'une seule fois en quatre mois. Plusieurs éléments pourraient expliquer ces différences, comme l'urbanisation galopante qui a lieu à Soumoussou depuis une dizaine d'années, et qui voit la destruction des gites favorables à

des vecteurs tels *An. funestus*, *An. rufipes* et *An. nili* au fur et à mesure de l'exploitation de l'espace par les nouveaux arrivants. Cependant, c'est plutôt l'utilisation de moustiquaires imprégnées qui peut le mieux concourir à expliquer cette diminution étant donné le statut sensible d'*An. funestus* [38] et d'*An. nili* aux insecticides utilisés pour l'imprégnation de ces moustiquaires [49] d'une part, et la forte antropophilie de ces vecteurs [50]. L'utilisation de moustiquaires et la sensibilité aux insecticides d'*An. funestus* pourrait d'ailleurs également expliquer le comportement visiblement exophile de cette espèce de nos jours à Soumoussou, qui était pourtant reportée comme majoritairement endophile [51]. Ainsi, les moustiquaires sélectionneraient une population d'*An. funestus* exophile et exophage, ou entraîneraient le développement d'une résistance comportementale chez cette espèce afin d'échapper aux moustiquaires. *An. rufipes* est également plus exophile qu'endophile alors que le contraire est reporté dans la littérature [42]. Nos données montrent que cette espèce est largement sensible aux insecticides couramment utilisés (30 *An. rufipes* sur 30 testés n'étaient pas porteurs de la mutation *Kdr* (*i.e.* génotype SS)) et cette caractéristique pourrait être liée à l'utilisation massive de moustiquaires comme pour *An. funestus*. Son comportement trophique largement zoophile l'épargne de contacts délétères avec les moustiquaires imprégnées, mais celles-ci pourraient agir comme répulsif et forcer un comportement exophile chez *An. rufipes*. *An. gambiae s.l.* pour sa part est majoritairement résistant aux insecticides couramment utilisés (70% de génotype RR, 30% de SS, n=30) et est ainsi retrouvé autant dans les maisons habitées que non habitées. Ainsi, nos données montrent une évolution notable de la composition et du comportement de la faune anophéline à Soumoussou. Il est à noter la plasticité trophique importante d'*An. gambiae s.l.* capable de se nourrir dans des proportions importantes sur des bovins (plus de 50% des femelles collectées dans les maisons non habitées se sont gorgées sur des bœufs). La proportion d'*An. gambiae s.l.* nourrie sur bœufs ne représentait que 15% des captures à Soumoussou en 2011. Cette tendance est donc à la hausse et accompagne probablement l'utilisation massive de moustiquaires. Si les densités de vecteurs autrefois majeurs à Soumoussou ont chuté majoritairement en raison de l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées, il n'en demeure pas moins que de nombreux changements dans le comportement de la faune anophéline sont à noter. Ainsi, par leur comportement trophique plastique ou par leur exophilie, ces moustiques constituent un réservoir de transmission du paludisme qui échappe aux méthodes classiques de lutte.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos données ne permettent pas de démontrer de manière formelle qu'*An.rufipes* est un vecteur actif dans la transmission de *Plasmodium falciparum* à Soumoussو. Notre effectif est toutefois faible, et, à la lumière de nos données, il aurait sûrement fallu concentrer nos efforts sur la capture des *An. rufipes* au sein des maisons habitées dans lesquelles la proportion de femelles gorgées sur homme atteint 25% afin de maximiser nos chances de trouver des *An. rufipes* infectés. Soumoussо n'est pas la seule zone où les densités d'*An. rufipes* sont remarquablement importantes. Les nombreuses prospections entomologiques réalisées par les équipes de l'IRSS/Centre Muraz rapportent au moins deux localités (*i.e.* Oursi (Extreme-Nord) et Tangonko (centre-Est)) où les densités d'*An. rufipes* dépassent celles d'*An. gambiae s.l.* à l'intérieur des maisons, favorisant sûrement le contact de ce moustique avec les hommes. De manière similaire, des captures sur homme réalisées à Tangonko ont permis de mettre en évidence une population d'*An. rufipes* particulièrement antropophile puisque le nombre de femelles agressives chez cette espèce dépassait celui des *An. gambiae s.l.* Des prospections dans ces zones prenant en compte la bio-écologie du vecteur et la géographie de la zone sont primordiales pour statuer sur le rôle de vecteur potentiel d'*An. rufipes*, en particulier dans les zones du Nord où les camps de refugies représentent typiquement une zone à risque. La région du Nord renferme une forte concentration humaine caractérisée par l'absence de richesses, matérialisées ailleurs par la possession de bovins ou d'ovins sur lesquels *An. rufipes* se nourrissent préférentiellement. Dans ces zones où la transmission du paludisme est strictement saisonnière, la bio-écologie d'*An. rufipes* (*i.e.* sa persistance en saison sèche) pourrait donc entraîner une augmentation de la transmission du paludisme dans le temps. Par ailleurs, nos données préliminaires montrant une plus faible susceptibilité à l'infection chez *An. rufipes* sont très intéressantes. Cette espèce pourrait, si cette tendance est confirmée, constituer une espèce modèle dont l'étude permettrait de mieux comprendre les déterminants génétiques de la résistance des vecteurs à *Plasmodium falciparum*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO. rapport 2014 sur le paludisme dans le monde. *World Malaria Report 2014.* , 2014:1-3.
2. M.S. Cas de paludisme simple et grave dans les formations sanitaires *Annuaire Statistique Sanitaire- Ministere de la Sante.* , 2014:256-61.
3. Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, et al. *Plasmodium knowlesi* in Human, Indonesian Borneo. *Emergency Infectious Diseases.* , 2010;16(4): 672-4.
4. PNLP. Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2006-2010. , 2007:23-4.
5. Alonso P, Lindsay S, Armstrong Schellenberg J, Keita K, Gomez P, Shenton F, et al. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria: A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, west Africa.6. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* , 1993;87(2):37-44.
6. Osse R, Aikpon R, Padonou GG, Oussou O, Yadouleton A, Akogbeto M. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasit Vectors.* , 2012;5:163.
7. PNLP. Directives nationales de lutte contre le paludisme. , 2011.
8. Ross R. The prevention of malaria. 2nd London: John Murray. , 1911.
9. Carnevale P, V. Robert., Manguin S, Corbel V, Fontenille D, Garros C, et al. Les anophèles:Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle, 2009.
10. Majori G, Sabatinelli G, Coluzzi M. Efficacy of permethrin-impregnated curtains for malaria vector control. *Med Vet Entomol.* , 1987;1(2):185-92.
11. Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia.* , 1999;41(4):595-611.
12. Boudin C, Robert V, Verhave JP, Carnevale P, Ambroise-Thomas P. *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* epidemiology in a West African village. *Bull World Health Organ.* , 1991;69(2):199-205.
13. Brieger B, Badolo O, Yansaneh A, Waxman R, Roman E. Rapport sur la mise en oeuvre du programme de lutte contre le paludisme au Burkina Faso. *MCHIP/USAID -PNLP.* 2013.
14. Knight KL, Stone A. A Catalog of the mosquitoes of the world (*Diptera: Culicidae*) :The Thomas Say Foundation. *Entomological Society of America.* , 1977;6: 2-3.

15. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors.* , 2012;5:69.
16. Dabire KR, Diabate A, Pare-Toe L, Rouamba J, Ouari A, Fontenille D, et al. Year to year and seasonal variations in vector bionomics and malaria transmission in a humid savannah village in west Burkina Faso. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology.* , 2008;33(1):70-5.
17. Fontenille D, Lagneau C, Lecollinet S, Lefait RR, Setbon M, Tirel B, et al. La lutte antivectorielle en France = Disease vector control in France. *IRD-Marseille.* , 2009:533.
18. Dye C. The analysis of parasite transmission by blood sucking insects. *Annu Rev Entomol.* , 1992;37:1-19; Tran A, Biteau-Corollier F, al. e, . Modélisation des maladies vectorielles. *Epidemiol et sante anim.* , 2005;47:35-51.
19. Lefevre T, Vantaux A, Dabire KR, Mouline K, Cohuet A. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* , 2013;9(6):e1003365.
20. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* , 2000;14:1-5.
21. Vaughan A, Hemingway J. Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* , 1995;270:17044-49.
22. Silva APB, Santos JMM, Martins AJ. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasites & Vectors.* , 2014;7(450):1-14.
23. Martinez-Torrez D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology.* , 1998; 7:179-84.
24. Fournier D, Bride JM, Hoffmann F, Karch F. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J Biol Chem* , 1992; 267:14270-4; Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol.* , 1994;108C:19-31.
25. Soderlund DM, Bloomquist JR. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush, R.T., Tabashnik, B. E. (eds) Pesticides resistance in arthropods. *Chapman and Hall, New York.* , 1989:58-96.

- 26. Dabire RK, Namountougou M, Sawadogo SP, Yaro LB, Toe HK, Ouari A, et al.** Population dynamics of *Anopheles gambiae* s.l. in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides. *Parasit Vectors.* , 2012;5:127.
- 27. Bryan JH, Di Deco MA, Petrarca V, Coluzzi M.** Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.s in the Gambia, West Africa. *Genetica.* , 1982;59:167-76; **Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA.** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* , 1979;73(5):483-97; **Coluzzii M, Petrarca V, Di-Deco MA.** Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bollettino di Zoologia.* , 1985;52:45-63.
- 28. Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, et al.** The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia.* , 1998;40(4):477-511.
- 29. Bayoh MN, Thomas CJ, Lindsay SW.** Mapping distributions of chromosomal forms of *Anopheles gambiae* in West Africa using climate data. *Med Vet Entomol.* , 2001;15:267-74.
- 30. Favia G, Torre AD, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N F, Toure YT, et al.** Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect MolBiol.* , 1997;6:377-83.
- 31. Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Nora J, et al.** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* , 2013;3619(3):1-29
- 32. Boissiere A, Gimmonneau G, Tchioffo TM, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambe'ne' PH, et al.** Application of a qPCR Assay in the investigation of susceptibility to Malaria infection of the M and S molecular forms o f *An. gambiae* s.s. in Cameroon. , 2013; 8 (1):1-10.
- 33. Ndiath MO, Cohuet A, Gaye A, Konate L, Mazenot C, Faye O, et al.** Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malar J.* , 2011;10:269.
- 34. Fryxell RT, Nieman CC, Fofana A, Lee Y, Traore SF, Cornel AJ, et al.** Differential *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles gambiae* s.s. molecular and chromosomal forms in Mali. *Malar J.* 2012;11:133.

- 35. Gnémé A, Guelbéogo W, M., Riehle MM, Sanou A, Traoré A, Zongo S, et al.** Equivalent susceptibility of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *Anopheles arabiensis* to *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. *Malaria Journal* , 2013; 12(204).
- 36. Mouline K, Mamai W, Agnew P, Tchonfienet M, Brengues C, Dabire R, et al.** Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol.* , 2012;26(4):447-54.
- 37. Pages F, Orlandi-Pradines E, Corbel V.** [Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]. *Med Mal Infect.* 2007;37(3):153-61.
- 38. Dabire KR, Baldet T, Diabate A, Dia I, Costantini C, Cohuet A, et al.** *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol.* 2007;44(6):990-7.
- 39. Dia I, Lochouarn L, Boccolini D, Costantini C, Fontenille D.** Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite.* 2000;7(3):179-84.
- 40. Guelbeogo WM, Sagnon N, Liu F, Besansky NJ, Costantini C.** Behavioural divergence of sympatric *Anopheles funestus* populations in Burkina Faso. *Malar J.* 2014;13:65.
- 41. Holstein MH.** Un nouveau vecteur du paludisme en A.O.F., *Anopheles rufipes* Gough 1910. *Entomologie Médicale et Veterinaire -ORSTOM* 1960 (379).
- 42. Holstein MH.** Note sur l'épidémiologie du paludisme en Afrique Occidentale Française. *Bull World Hlth Org.* , 1951; 4 463-73.
- 43. Da DF, Diabaté A., Mouline.K., Lefèvre.T., Awono-Ambene.H.P., Ouédraogo.J.B., et al.** *Anopheles rufipes* remains a Potential Malaria Vector after the First Detection of Infected Specimens in 1960 in Burkina Faso. *J Infect Dis Ther.* 2013;1(3):1-2.
- 44. Gillies M, Coetzee M.** A supplement to the *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Johannesburg, South Africa. *South African Institute for Medical Research.* 1987; **Gillies M, De Meillon B.** The *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Publication of the South. *Afr Inst Med Res.* 1968;54:343.

- 45.** Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of Anopheles gambiae molecular forms. *Malar J.* 2008;7:163.
- 46.** Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP, 2nd, et al. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol.* , 1988;25(1):9-16.
- 47.** Hothorn LA, Reisinger K, Wolf T, Poth A, Fieblinger D, Liebsch M, et al. Statistical analysis of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN assay). *Elsevier.* 2013(757):68-78.
- 48.** Diagne N, Fontenille D, Konate L, Faye O, Lamizana MT, Legros F, et al. Les anophèles du sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* 1994;4:267-77; Hamon J, Taufflieb R, Dyemkouma A. Observations sur la variabilité d'*Anopheles rufipes*, Gough, 1910, avec description d'une nouvelle variété. *Bulletin de la société de pathologie exotique.* 1961:24-8; Hamon J, Adam JP, Grjebine A. Observations sur la repartition et le comportement sur les anopheles de l'Afrique Equatoriale Française, du Cameroun et de l'Afrique Occidentale. *BullWldHlthOrg.* 1956;15:549-91.
- 49.** Golf G, Robert V, Fondjo E, Carnevale P. Efficacy of insecticides impregnated bed-nets to control malaria in rural forested area in southern Cameroon. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio DE Janeiro.* 1992;87:355-59.
- 50.** Toe KH, Jones CM, N'Fale S, Ismail HM, Dabire RK, Ranson H. Increased pyrethroid resistance in malaria vectors and decreased bed net effectiveness, Burkina Faso. *Emerging infectious diseases.* , 2014;20(10):1691-6.
- 51.** Pihervy J, Sales S. Evaluation au stade IV dans la station experimentale de Soumousso (Haute-Volta) de l'efficacité d'un insecticide, l'OMS-2002, sur les adultes d'Anopheles à deux concentrations et selon deux types d'aspersions intra-domiciliaires (0.5g/m² et 0.25g/m²). *ORSTOM.* 1982:1-9.

VIII. Annexes



PROTOCOLE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



Annexe 1 : Extraction d'ADN au CTAB, sur moustique entier

Myriam et Cécile, avril 2003

D'après : une technique que faisait Myriam dans son ancien laboratoire ; pas de publication à ce jour.

- 1- Broyer chaque moustique dans 200 µl de CTAB 2%.
- 2- Mettre au Bain-marie 65°C pendant 5 minutes.
- 3- Ajouter 200 µl de chloroform – Mélanger par inversion.
- 4- Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm, à température ambiante.
- 5- Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube.
- 6- Ajouter 200 µl d'Isopropanol sur ce surnageant et bien mélanger par inversion.
- 7- Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm et température ambiante.
- 8- Vider l'Isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 µl d'Ethanol 70%.
- 9- Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm, à température ambiante.
- 10- Vider l'Ethanol.
- 11- Sécher le culot pendant 5 minutes maximum au speed-vac.
- 12- Reprendre dans 20 µl d'H₂O – Ne pas vortexer – Laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une 1/2 journée).

CTAB 2%

Réactifs	Volume	conc. Finale
1 M Tris HCl PH 8.0	100 ml	10 mM
0.5 M EDTA	20 ml	10 mM
NaCl	81.8 g	1.4 M
CTAB*	20 g	2%
dd H ₂ O	QSP 1L	

* Cétyl triméthyl ammonium bromide

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à température ambiante.

Annexe 2: Protocole des PCRs

1. Protocole ITS-2rDNA

Amorces

ITS2A 5' TGTGAAC TG CAGGACACATG 3'

ITS2B 5' TATGCTTAAATTCA GGGGGT 3'

2. Protocole PCR SINE 200X 6.1 LOCUS

Amorces

Sine 200X 6.1 F: TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA

Sine 200X 6.1 R: CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC

3. Protocole PCR diagnostique de *Plasmodium falciparum*

Amorces

P.f F (P1) : 5' GGA ATG TTA TTG CTA ACA C 3'

P.f R (P2): 5' AAT GAA GAG CTG TGT ATC 3'

Annexe 3: Protocole ELISA-repas de sang

Technique Fontenille D., d'après Beier J et al., (1988).

01. Préparer les Tampons

i. Préparer le **Tampon «Repas de sang»** (à garder + 4° C, 1 à 2 semaines)

Pour **1/2 litre**:

- 2,5g de caséine dans 50 ml de NaOH 0,1 N ; faire bouillir jusqu'à totale dissolution
- ajouter 450 ml de PBS
- ajouter 0,025% Tween 20 (soit 125 µl/l/2 l)
- ajouter 0,05 g Thiomerosal
- ajouter 0,01 g Phénol rouge

Agiter 2 heures

PBS : 9,7 g de PBS en poudre Sigma dans 1 L d'eau distillée

ii. Préparer le **Tampon citrate pH4**

Pour **1 litre**:

- Acide citrique, 1 H₂O : 11,77 g
- Hydroxyde de sodium : 4,48 g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution. Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide chlorhydrique 1N. Compléter à 1l avec de l'eau bidistillée.

02. Broyer les abdomens dans 250 µl de PBS, ajouter ensuite environ 750 µl de PBS.

Avec **SPOTS** (Confetti sur papier filtre) * Découper le spot, le mettre environ dans 0,8 ml de PBS (selon la quantité probable de sang) * Vortexer 1 ou 2 fois * Laisser au moins 1 h.

03. Préparer les témoins positifs: sang dilué au 1/100 en moyenne.

10µl de sérum d'espèce dans 1 ml de PBS (homme (10/100), poulet (1/200), bœuf (10/100), mouton (1/30), chèvre (1/30), porc (1/100), cheval (1/100), chien (1/100), rat,).

04. Sensibiliser les plaques

Mettre 50µl de solution de sang à tester par puits (un moustique par colonne).

05. Incubation 3 heures à la température de la pièce ou la nuit à + 4° C

06. Préparer les anticorps spécifiques d'espèce marqués à la peroxydase:

Reconstituer les IgG marquées selon la notice. Garder au congélateur.

Pour une plaque il faut :

$50 \mu\text{l} \times 12 = 600 \mu\text{l}$ (+ 50 µl) = **650 µl** de solution de chaque IgG marquées.

Dilution à faire (dilution à vérifier par un damier, fonction de la marque):

			+ 2 ml Tampon pour 3
Homme	1/2000	2 µl IgG	plaques
Bœuf	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Poule	1/2000	1 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Mouton	1/500	4 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Cheval	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Porc	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Chien	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon
Rat	1/1000	2 µl IgG	+ 2 ml Tampon

07. Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les **sérum hétérologues** au 1/1000^{ème}.

Exemple: Tube anti-homme : aux AC marqués anti-homme dans 4 ml tampon, ajouter 4 µl de sérum de bœuf + 4 µl de sérum de poule + 4µl de sérum de mouton + 4 µl de sérum de cheval + 4 µl de sérum de porc + 4 µl de sérum de chèvre + 4 µl de sérum de chien etc ... (tous les autres sérum sauf Homme).

SAUF pour Mouton et chèvre: NE PAS mettre de sérum de mouton avec AC marqués anti-chèvre. NE PAS mettre de sérum de chèvre avec AC marqués anti-mouton.

08. Vider la plaque. **Laver 2 fois** au PBS-Tween 20

PBS-Tween 20: 500 µl de Tween 20 dans 1L de PBS, agiter.

09. Distribuer **50 µl** par puits de solution d'IgG marquée, mettre une IgG / rangée

10. Incubation 1 heure à RT sur la paillasse

11. Vider la plaque. **Laver 4 fois** au PBS-Tween 20.

12. 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer le **substrat de la peroxydase** (selon Lhuillier, Sarthouet *al.*) :

Pour **3 plaques** :

- 5 mg d'Ortho-toluidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- 30 ml de Tampon citrate
- 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30%).

13. Distribuer 100 µl de substrat par cupule

14. Incubation à l'obscurité, pendant 30 minutes (coloration bleue 620 nm)

15. Blocage par 50 µl d'acide sulfurique 4N : coloration jaune

16. Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur ELISA.