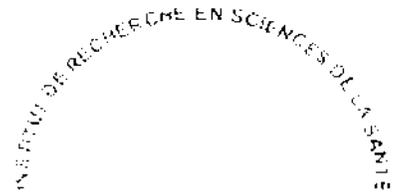


N° d'ordre :



**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO
(UPB)
INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)**



MEMOIRE

Présenté par :

Robert Kossivi OUEDRAOGO

Maître es Sciences Biochimie-Microbiologie Appliquée

Pour l'obtention du :

**diplôme d'études approfondies en Biologie
Appliquée et Modélisation des Systèmes
Biologiques**

Sur le thème :

***Mise en évidence de l'alimentation sucrée chez les vecteurs du
paludisme dans deux localités de l'Ouest du Burkina Faso.***

Soutenu publiquement le 11 Avril 2008

Jury :

Dr. TARNAGDA Zékiba

IRSS/DRO Bobo-Dioulasso

Dr. GOUAGNA Louis Clément

IRD/IRSS Bobo-Dioulasso

Pr. OUEDRAOGO A. Georges

Université Polytechnique de Bobo

DEDICACE

A mon très cher père OUEDRAOGO R. Augustin

A ma très chère mère SEYDOU Amina Cécile

A ma très chère soeur Prisca

A toute ma famille

REMERCIEMENTS

Fruit de la collaboration entre les instituts de recherche IRD, IRSS et Centre Muraz (Burkina Faso), le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre des activités de recherche de notre DEA menées au sein du laboratoire d'Entomologie médicale (IRSS/Centre Muraz (Bobo)). Ce travail n'aurait pu se concrétiser sans le concours de plusieurs personnes auxquelles nous avons le réel plaisir d'exprimer nos profondes gratitude. Nous voudrions remercier en particulier:

Le **Pr. Jean Bosco OUEDRAOGO**, Directeur régional de l'institut de Recherche en Science de la Santé/Bobo-Dioulasso pour nous avoir accueilli au sein de votre institution. Trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Le **Dr. Louis Clément GOUAGNA**, pour avoir accepté de superviser et de guider ce travail avec rigueur et disponibilité malgré vos multiples occupations. Vos grandes connaissances scientifiques et vos qualités de chercheur nous ont permis de bénéficier pleinement de votre expérience dans le domaine de la recherche. Vous avez été plus qu'un encadrant, un frère. Votre soutien a été inestimable dans la réalisation de ce travail. Nous vous remercions infiniment pour les moyens matériels et scientifiques mis à notre disposition pour ce travail. Permettez nous de vous traduire toute notre gratitude et notre profond respect.

Le **Dr. Rock K DABIRE**, pour avoir accepté de co-guider ce travail. Nous avons été émerveillé par votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre grand humanisme, votre simplicité. L'atmosphère du travail a même suscité en moi le germe de la recherche. En dépit de vos multiples occupations, vous n'avez ménagé aucun effort pour un suivi rigoureux de ce travail. Nous vous remercions infiniment pour les moyens matériels et scientifiques mis à notre disposition pour ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Le **Dr. Serge DJABOUGA**, Directeur Général du centre Muraz pour nous avoir accepté dans votre laboratoire. Trouvez ici, l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

Le **Pr. Robert T. GUIGUEMDE**, Chef du département Parasitologie et Entomologie du centre Muraz pour les différentes formations dont nous avons bénéficiées. Veuillez accepter nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

Le **Dr. Hermann SORGHO**, pour avoir participé à la réalisation de ce document. Merci car vos conseils nous ont permis de finaliser ce document.

A **Mr Ali OUARI** et **Mr Bienvenu YAMEOGO**, pour nous avoir assisté dans nos travaux de terrain et de laboratoire.

A toute l'équipe du laboratoire d'Entomologie médicale du Centre Muraz, nos vifs remerciements pour l'esprit d'équipe et de franche camaraderie qui a prévalu tout au long de ce travail réalisé.

A tout le personnel de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS/Bobo), pour l'accueil et l'appui apporté.

A tous les enseignants, étudiants, amis et parents qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à notre formation, nous présentons nos vifs remerciements.

Table des matières

Sigles et Abréviations	v
Liste des Tableaux et Figures	vi
Résumé.....	vii
1. INTRODUCTION.....	1
2. GENERALITES SUR LE PALUDISME	3
2.1. Les vecteurs de paludisme.....	3
2.1.1. Taxonomie	3
2.1.2. Biologie des vecteurs de paludisme.....	3
2.1.3. Le groupe <i>Anopheles funestus</i>	3
2.1.4. Le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	4
2.2. Ecologie et Cycle de développement des anophèles	5
2.2.1. Phase aquatique	6
2.2.2. Phase aérienne	7
2.3. Cycle trophogonique et comportement des Anophèles.....	7
2.3.1. La recherche de l'hôte	7
2.3.3. La digestion du sang et la maturation ovarienne	8
2.3.4. Comportement de reproduction	8
2.3.5. La recherche du site de ponte et la ponte.....	9
2.3.6. Cycle d'agressivité.....	9
2.3.7. Notions de capacité et compétence vectorielles	10
2.3.8. Dispersion	11
2.4. La lutte anti-vectorielle.....	12
2.4.1. La lutte anti-larvaire	12
2.4.2. La lutte contre les adultes	14
3. METHODOLOGIES.....	16
3.1. Etude de terrain	16
3.1.1. Sites d'étude.....	16
3.1.2. Echantillonnage des moustiques.....	17
3.2. Dissection des moustiques	18
3.2.1. Cold Anthrone test ou test de fructose.....	18
3.2.2. Identification moléculaire par PCR	20
3.2.3. Détermination de l'origine du repas de sang	21
3.3. Analyse statistique des données	22
4. RESULTATS.....	23
4.1. Caractérisation des échantillons d'anophèles capturés.....	23
4.2. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction de la localité	23
4.3. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction du sexe des vecteurs dans les deux sites de l'étude.....	24
4.4. Variation saisonnière de la fréquence de repas sucré chez les vecteurs.	25

4.5. Fréquences de repas sucré chez les formes moléculaires M et S d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s.	26
4.6. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction des statuts physiologiques des femelles d'anophèles	27
4.6.1. Influence de l'état d'insémination des femelles sur la fréquence de repas sucré.....	27
4.6.2. Influence de l'état physiologique des femelles sur la fréquence de repas sucré.....	28
4.7. Influence des sources de repas sanguin sur la fréquence de repas sucré chez les femelles capturées gorgées de sang.....	29
4.8. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction de l'âge physiologique des femelles d'anophèles.....	30
5. DISCUSSION	32
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	36
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
8. ANNEXE.....	44

Sigles et Abréviations

ADN	: Acide Desoxyribo-Nucléique
°C	: Degré Celsius
µl	: Microlitre
al.	: Collaborateurs
Amorce B/S int	: Amorce spécifique à la forme moléculaire S d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s.
Amorce Mop/int	: Amorce spécifique à la forme moléculaire M d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s.
Amorces R5 et R3	: Amorces communes (Forward et Reverse) à <i>Anopheles gambiae</i> s.s.
An.	: <i>Anopheles</i>
bp	: Paire de base
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
DNTP	: DésoxyriboNucléotideTriPhosphate
Km	: Kilomètre
m	: mètre
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
mn	: Minute
ddl	: Degré de liberté
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RFLP	: Restriction fragment Length Polymorphism
WHO	: World Health Organization

Liste des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau I : Conditions PCR avec la Taq Quiagen, pour un volume final de 25 µl par réaction	20
Tableau II : Répartition des espèces de moustiques collectés entre Mars et Octobre 2007 à la Vallée du Kou (VK5 et VK7) et à Soumousso.	23
Tableau III : Relation entre fréquence de repas sucré et la tendance trophique vis-à-vis des hôtes vertébrés des femelles d'anophèles capturés à la Vallée du Kou et à Soumousso.	30

Figures

Figure 1 : Cycle de développement du moustique.....	5
Figure 2 : Localisation des deux sites de l'étude, Vallée de Kou et Soumousso, Burkina Faso, 2007.	17
Figure 3 : Fréquence de repas sucré chez les vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumousso	24
Figure 4 : Variation de repas sucré en fonction du sexe des anophèles à la Vallée du Kou et à Soumousso.....	25
Figure 5 : Fréquences saisonnières de repas sucré chez les vecteurs à la Vallée du Kou.....	26
Figure 6 : Fréquences de repas sucré chez les formes moléculaires M et S d' <i>Anopheles gambiae s.s.</i> à la Vallée du Kou et à Soumousso.....	27
Figure 7 : Fréquences de repas sucré en fonction de l'état d'insémination des femelles des vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumousso	28
Figure 8 : Fréquence de repas sucré en fonction des états physiologiques des femelles des vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumousso.	29
Figure 9 : Variation de repas sucré en fonction de l'âge physiologique des femelles des vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumousso	31

RESUME

Le comportement trophique des vecteurs de paludisme en rapport avec les plantes a été étudié, dans deux localités différentes, Vallée du Kou (Bama) et Soumousso situés à l'Ouest du Burkina Faso. Entre Mars et Octobre 2007, plus de 1600 moustiques ont été capturés à l'extérieur et à l'intérieur des habitations par différentes techniques de collecte. La présence ou non de fructose dans l'estomac des moustiques a été mise en évidence par le Cold Anthrone test; un test positif indiquant une prise récente de sucre sur les plantes par le moustique correspondant. L'espèce *Anopheles gambiae* s.l. a été majoritairement collectée dans les deux localités. Des moustiques analysés, 70-85,2% des mâles et 49,5-40,1% des femelles ont été positifs au test de fructose, respectivement à la Vallée et à Soumousso. L'analyse PCR des formes moléculaires d'*Anopheles gambiae* s.s. a montré que 59% des formes M et 80% des formes S ont pris le sucre à la Vallée du Kou contre 77,6% des formes M et 85,2% des formes S à Soumousso et ceci quel que soit leur statut physiologique. Le sucre végétal a été observé aussi bien chez les femelles inséminées que chez les non inséminées dans les deux sites d'étude. Parallèlement, 53,5% et 66,7% des femelles nullipares ont pris un récent repas de sucre contre 38,5% et 44,8% des femelles pares respectivement à la Vallée et à Soumousso. Collectivement, ces résultats indiquent que l'alimentation sucrée est un aspect important de l'écologie des vecteurs de paludisme.

Mots clés : *Anopheles*, comportement trophique, Anthrone, Burkina Faso

1. INTRODUCTION

Le paludisme est l'une des maladies parasitaires les plus répandues dans le monde. Il est causé par un protozoaire hématophage du genre *Plasmodium* et est transmis par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Quatre espèces de *Plasmodium* sont à l'origine du paludisme chez l'homme: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. *Plasmodium falciparum* est responsable de la forme la plus sévère de la maladie et de la plupart des décès dus au paludisme (WHO, 1998). L'incidence mondiale de cette parasitose est estimée entre 300 à 500 millions de cas cliniques par an et plus de 80% de ces cas surviennent en Afrique au Sud du Sahara (Manguin et al, 1999; WHO, 2005). Au Burkina Faso, on estime à environ 600000 le nombre annuel de cas de paludisme dont 30% surviennent chez les enfants de moins de 5 ans (Annuaire statistique du Burkina Faso, 2002).

En Afrique subsaharienne et en particulier au Burkina Faso, *Anopheles gambiae* s.l. et *An. funestus* constituent les vecteurs majeurs de paludisme (Gillies et De Meillon, 1968; Fontenille et al., 2003). Plusieurs études ont été réalisées en Afrique de l'Ouest sur le comportement trophique des *Anopheles* vecteurs de paludisme, notamment vis-à-vis des hôtes vertébrés (Dia et al., 2003; Adja et al., 2006). La diversité des comportements entre espèces et au sein d'une même espèce d'*Anopheles* ainsi que les conditions climatiques, géographiques et l'action de l'homme sur le milieu conditionnent le niveau du contact homme-vecteur. Ces vecteurs sont avant tout des moustiques ruraux et se rencontrent en théorie moins en ville. Dans la pratique, l'adaptation de certaines espèces au milieu urbain et la pratique du maraîchage dans ou à la périphérie des grandes agglomérations sont à l'origine de la persistance de populations anophéliennes en ville. Il va de soit que, pour une lutte efficace contre les vecteurs de paludisme, une meilleure connaissance de la relation de ces vecteurs avec leurs cadres écologiques et en particulier leur comportement trophique en relation non seulement avec l'Homme mais aussi avec les plantes, est indispensable. En effet pendant les premiers jours de leur existence, les adultes mâles et femelles ont besoin de premier repas sucré, pris le plus souvent au crépuscule, à base de nectar ou de substances secrétées par des plantes (Yuval, 1992; Müller et Schlein, 1995; Foster, 1995). Pendant la durée de leur vie, les moustiques des deux sexes ont besoin pour accomplir leur activités (vol accouplement, etc.), de constituer régulièrement de réserves énergétiques émanant du nectar des fleurs ou d'autres sécrétions végétales ou encore sur des fruits mûrs (Gary et Foster, 2004; Müller et Schlein, 2005). Cependant l'importance de ce comportement a été jusqu'à présent très peu étudiée dans les conditions naturelles.

L'objectif général de notre étude est d'évaluer l'importance de l'alimentation en sucre végétal chez les vecteurs majeurs du paludisme dans des conditions naturelles, partant des observations recueillies sur des moustiques récoltés dans de cadres écologiques différents (Vallée de Kou (Bama) et Soumousso) à l'Ouest du Burkina Faso.

Les objectifs spécifiques de notre étude on été:

- de déterminer la fréquence de repas sucré chez les anophèles dans les deux zones d'étude.
- Etudier les relations entre la fréquence de repas sucré et les statuts physiologiques des femelles de ces vecteurs.

2. GENERALITES SUR LE PALUDISME

2.1. Les vecteurs de paludisme

2.1.1. Taxonomie

Les moustiques sont des arthropodes trachéates de la classe des Insectes, de la sous classe des Ptérygotes, de l'ordre des Diptères, du sous ordre des Nématocères et de la famille des Culicidés. Cette famille est composée de trois sous familles regroupant 37 genres et environ 3200 espèces dans le monde: les *Anophelinae* (3 genres), les *Culicinae* (33 genres), les *Toxorhynchitinae* (1 genre). La sous famille des *Anophelinae* est la plus importante sur le plan médical. Elle est composée de trois genres: *Bironella* (Theobald, 1905), *Chagasia* (Cruz, 1906) et *Anopheles* (Meigen, 1818). Seul le genre *Anopheles* contient les espèces vectrices de l'agent responsable de paludisme humain. Plus de 450 espèces d'*Anopheles* ont été recensées sur la planète, mais 70 à 80 seulement sont considérées comme vecteurs de maladies (Rodhain et Perez, 1985; Mouchet *et al.*, 2004).

2.1.2. Biologie des vecteurs de paludisme

La biologie des principaux vecteurs en Afrique et leur rôle dans la transmission du paludisme sont connus dans leurs grandes lignes depuis plus de 50 ans (MacDonald, 1957). La description et l'identification des espèces vectrices se faisaient alors sur des critères morphologiques et des sous-divisions intitulées sous-espèces, formes, races, variétés étaient signalées sur la base des critères géographiques, comportementaux ou de petites différences morphologiques à un stade de développement donné de l'anophèle (Fontenille *et al.*, 1992; Wondji, *et al.*, 2002; Mouchet, 2004). Les paragraphes suivants vont être consacrés aux spécificités de quelques espèces majeures responsables de la transmission du paludisme en Afrique.

2.1.3. Le groupe *Anopheles funestus*

Les espèces du groupe *An. funestus* sont encore mal connues. On sait depuis des années 1930, que ce groupe se compose de plusieurs espèces proches qui ne peuvent être différenciées que par de très discrets caractères sur les larves ou les adultes. *An. funestus*, *An. confusus*, *An. leesoni*, *An. rivulorum* et *An. brucei* sont déterminables au stade larvaire, alors que les espèces du

sous groupe *funestus*: *An. funestus*, *An. parensis*, *An. aruni* et *An. vaneedeni* peuvent être identifiés par de petites différences morphologiques chez les adultes (Gillies et Coetzee, 1987). Leur biologie et leur capacité vectorielle sont très différentes. A l'exception d'*An. funestus*, ces espèces semblent essentiellement zoophiles. Des *Plasmodium* humains n'ont été trouvés que chez *An. funestus* qui est un excellent vecteur, à capacité vectorielle élevée par rapport aux autres espèces citées ci-dessus (Wilkes et al., 1996). L'identification précise de l'espèce dans le groupe est donc d'une grande importance pour la lutte anti-vectorielle. Depuis 1998, plusieurs techniques de biologie moléculaire dont la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permettent de différencier les espèces du groupe *An. funestus* (Wilkes et al., 1996; Costantini et al., 1999; Cohuet et al., 2003).

2.1.4. Le complexe *Anopheles gambiae*

On désigne sous le nom de complexe d'espèces, des espèces dites jumelles, car morphologiquement indifférenciables, dont l'identification demande l'utilisation de critères cytogénétiques ou l'analyse de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mouchet et al., 2004). A l'état actuel de la taxonomie, le complexe *An. gambiae* est divisé en 7 espèces jumelles, dont les croisements inter spécifiques en laboratoire donnent naissance à des mâles stériles (White, 1974 ; Hunt et al., 1998): *Anopheles gambiae sensu stricto* (Giles, 1902); *An. arabiensis* (Patton, 1905); *An. quadriannulatus* espèce A (Theobald, 1911); *An. quadriannulatus* espèce B. (Hunt et al., 1998); *An. bwambae* White, 1985; *An. melas* Theobald, 1903; et *An. merus* (Doenitz, 1902).

Le potentiel adaptatif d'*An. gambiae s.s.* à des environnements très différents est en grande partie lié à la présence d'inversions chromosomiques polymorphes observées notamment sur le chromosome 2. Cinq «formes chromosomiques» ont ainsi été définies en Afrique de l'Ouest: les formes Forêt, Savane, Bamako, Bissau et Mopti (Coluzzi et al., 1979 ; 1985, 2002 ; Touré et al., 1998) qui se répartissent principalement en fonction du degré d'aridité du milieu. Ainsi, la forme Forêt, caractérisée par l'arrangement standard (pas d'inversion) sur les deux bras du chromosome 2, peuple les environnement de forêt et de savane les plus humides, les formes Savane ou Mopti se retrouvent quant à elles dans des environnements plus secs voire très arides (Fontenille et al., 2003).

Depuis la fin des années 90, plusieurs équipes de recherche ont appliqué une approche moléculaire à cette problématique de spéciation chez *An. gambiae*. Ainsi l'étude des fragments

inter géniques des rDNA, a permis de définir des sites RFLP différenciant Mopti d'une part et Savane-Bamako d'autre part. Il a alors été possible de synthétiser des amorces pour une PCR spécifique permettant de révéler deux profils différents qu'on a appelé M et S (Favia et al., 1997 ; 2001). Si au Mali, au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire tous les spécimens Mopti appartiennent à la forme M alors que Savane et Bamako présentent toujours le profil S, ce n'est pas le cas dans les autres régions de l'Afrique (Della et al., 2001). Cependant, quelles que soient les régions, il a été clairement démontré que les flux de gènes entre la forme M et la forme S sont très réduits, démontrant un phénomène de spéciation en cours (Chandre et al., 1999).

2.2. Ecologie et cycle de développement des anophèles

Le développement de toutes les espèces de moustiques est caractérisé par la succession de deux phases: la première est aquatique et recouvre la vie pré-imaginale, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'adulte ou l'imago (Figure 1). Les particularités de ces deux phases constituent des critères systématiques de caractérisation de genres de moustiques.

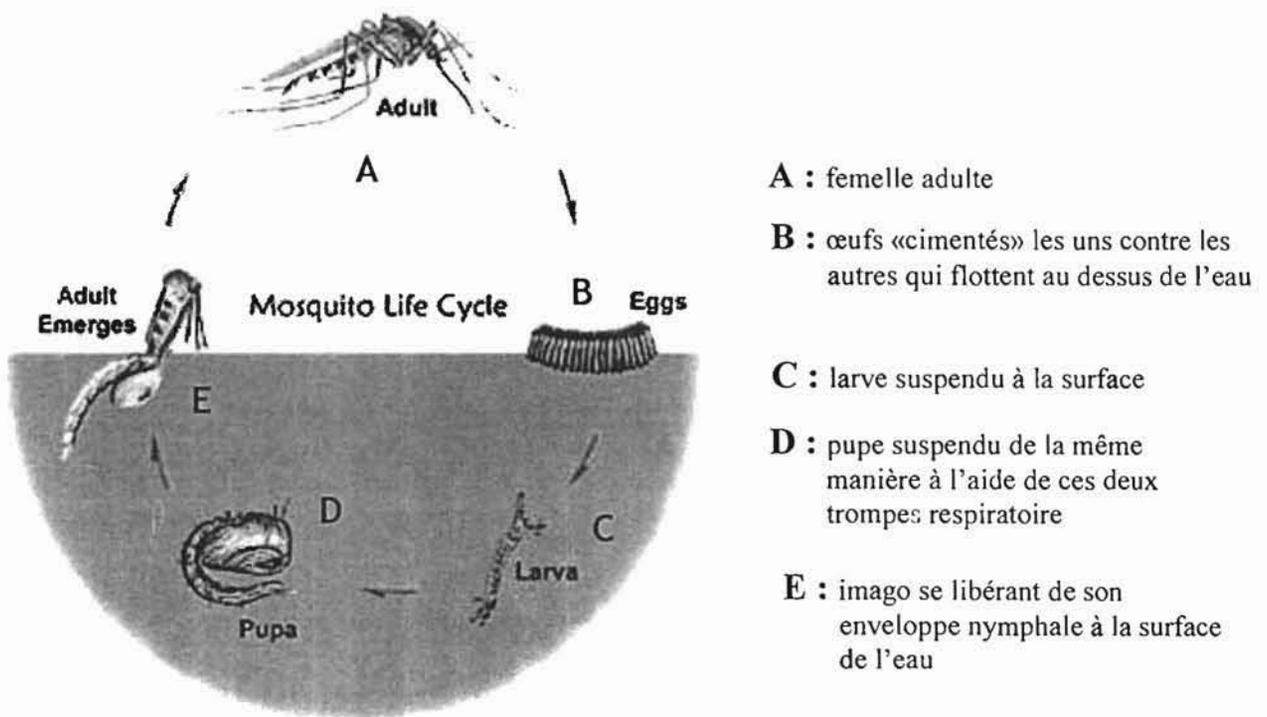


Figure 1 : Cycle de développement du moustique
 Source: <http://www.mosquito.org/mosquito-information/lifecycle.aspx>

2.2.1. Phase aquatique

Les différentes espèces d'anophèles exploitent une grande variété de plans d'eaux : eaux courantes rapides (*An. nili* en Afrique, *An. minimus* en Asie du sud Est), eaux courantes lentes (*An. moucheti* en Afrique centrale, *An. darlingi* en Amérique latine), mares résiduelles de décrues (*An. culicifacies* en Asie, *An. pseudopunctipennis* en Amérique latine), surfaces stagnantes ensoleillées (complexe *An. gambiae* en Afrique), marais à végétation dressée (*An. funestus* en Afrique, *An. albimanus* en Amérique centrale), collection d'eaux des sous bois (*An. dirus* et *An. balabacensis* en Asie du Sud-Est), eaux saumâtres côtières (*An. sondaicus* en Asie du Sud-Est, *An. melas* et *An. merus* en Afrique). L'évolution saisonnière de la qualité de l'eau et aussi de la végétation environnante permet à certaines espèces de se succéder dans le temps. Dans les rizières, par exemple, les espèces du complexe *An. gambiae* héliophiles, pullulent lors de la mise en eau et du repiquage. Avec la croissance du riz, elles sont remplacées par des espèces qui recherchent l'ombre et l'abri d'une végétation dressée: les exemples se retrouvent chez *An. pharoensis* en Afrique de l'Ouest et *An. funestus* à Madagascar (Robert *et al.*, 1989; Diabaté, 2003; Mouchet *et al.*, 2004).

Les anophèles femelles pondent à la surface d'eau des oeufs fécondés d'environ 1mm de longueur. Ces œufs pondus isolément, sont munis de flotteurs et restent de l'eau (Rozendaal, 1999). Chaque oeuf subit une embryogenèse aboutissant à une seule larve d'environ 1 mm (Rodhain et Perez, 1985). Par la suite le cycle se déroule en quatre stades larvaires, séparés par trois mues larvaires (Mouchet et Carnevale, 1991). La larve aquatique des anophèles se nourrit en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. A la température de 25°C, la croissance de la phase aquatique dure de 10 à 20 jours selon l'espèce (Darriet, 1998) à l'issue de laquelle une mue particulière appelée nymphose, libère une nymphe aquatique mobile, qui ne se nourrit pas. Pendant le stade nymphal, d'une durée généralement inférieure à 2 jours (Gwadz et Collins, 1996), de profonds remaniements morphologiques transforment les organes propres au stade larvaire (appareil buccal filtreur-broyeur, système digestif de en organes caractéristiques de l'adulte (ailes, pattes, appareil buccal piqueur-suceur, système détritophage-filtreur), initialement présents à l'état d'ébauche dans la larve digestif d'hématophage) apparaissent.

2.2.2. Phase aérienne

A la fin de son évolution, la nymphe se positionne sous la surface immédiate de l'eau. Elle s'étire, le tégument du céphalothorax se fend dorsalement suivant un plan sagittal et libère l'insecte adulte. Beaucoup de moustiques meurent à ce moment et la moindre agitation de l'eau provoque leur noyade. Dès son émergence, l'adulte se repose sur un support émergé (durant 10 à 24 heures pour la femelle et 72 heures pour le mâle). Pendant ce temps sa cuticule se durcit, ses ailes se déploient et l'appareil génital mâle ou genitalia subit une héli-rotation de 180°, le rendant fonctionnel. Mâles et femelles volent alors et vont à la recherche d'un repas de jus sucré, nectar des fleurs, fruits en décomposition et autres sécrétions végétales (Darriet, 1998). Ce repas doit leur permettre de couvrir leur besoin énergétique (Gille et Warrell, 1980 ; Rodhain et Perez, 1985 ; Mouchet et Carnevale, 1991 ; Mouchet *et al.*, 2004). Seule la femelle est hématophage : un repas sanguin n'est pas indispensable à sa survie, mais il l'est à la maturation ovarienne (Detinova, 1963) comprenant habituellement 150 oeufs chez *Anopheles gambiae*.

2.3. Cycle trophogonique et comportement des Anophèles

2.3.1. La recherche de l'hôte

Les femelles de la plupart des moustiques doivent prendre un repas sanguin afin de permettre aux œufs d'atteindre la maturation dans les ovaires. Cette maturation ovarienne s'effectue pendant qu'elle digère le sang (ce qui dure une quarantaine d'heures). Une fois les œufs développés, la femelle part à la recherche d'un lieu de ponte approprié. Cette séquence (repas sanguin, maturation des œufs et ponte) est répétée plusieurs fois au cours de la vie du moustique et s'appelle le cycle trophogonique (ou cycle gonotrophique). Ce cycle dure environ 48 heures chez les anophèles, à une température comprise entre 23°C et 25°C (Bregues et Coz, 1973; Bruce-Chwatt et De Julueta, 1985). Les femelles nullipares (qui n'ont jamais pondu par opposition aux femelles pares qui ont déjà pondu au moins une fois) ont parfois besoin de 2 ou 3 repas sanguins pour achever leur développement ovarien (Charlwood *et al.*, 2003).

Pour accomplir ce besoin, la femelle à jeun, se met de nuit à la recherche d'un hôte. La localisation de ce dernier se fait à plusieurs niveaux. L'identification des facteurs d'attractivité et des mécanismes de localisation et de la reconnaissance de l'hôte sont des domaines de recherches actuellement en plein essor. A longue distance, interviennent les stimuli olfactifs, tels que les kairomones spécifiques d'espèces animales (ou humaine); à moyenne distance, d'autres

attractifs interviennent, comme le gaz carbonique émis par la respiration; à courte distance ce sont la chaleur de l'hôte, l'humidité corporelle et divers facteurs visuels qui jouent un rôle déterminant. Pour la piqûre proprement dite, la chaleur émanant de l'hôte est un facteur primordial (Mouchet et Carnevale, 1991). Lors de la piqûre, la femelle injecte son proboscis sous la peau et le sang est ingéré par pompage après canulation directe d'un capillaire sanguin. Simultanément le moustique injecte une salive anticoagulante pour faciliter l'absorption du sang jusqu'à la réplétion complète de l'estomac de l'insecte. En plus des anticoagulants, cette salive contient des substances anti-inflammatoires, des enzymes digestives et des vasodilatateurs (Robert *et al.*, 1999). Le repas de sang se fait en général en une fois, mais il peut être interrompu et fractionné si l'insecte est dérangé. Ces «repas interrompus» étaient considérés comme des comportements atypiques jusqu'au moment où l'on a constaté que 15% des espèces d'*An. gambiae s.s* peuvent se nourrir sur au moins deux personnes successivement (Boreham, 1975; Kulkarni et Panda, 1984). Sinon pendant la prise de repas sanguin, la femelle concentre le sang en libérant un liquide clair ou plasma; ce phénomène appelé «diurèse» permet d'absorber jusqu'à 1,5 à 2ul de sang, en fonction de la taille de la femelle.

2.3.3. La digestion du sang et la maturation ovarienne

Après le repas du sang, la femelle se repose le plus souvent près du sujet sur lequel elle s'est nourrie, pour les espèces endophiles. Pendant la digestion, les ovocytes, grossissent jusqu'à occuper la plus grande partie de l'abdomen qui paraît blanc par transparence. Suivant leur état de réplétion, on classe les spécimens en femelles «à jeun» ou non gorgées, en femelles gorgées (abdomen rouge du fait du sang frais ingéré), en femelles semi-gravides (abdomen noirâtre contenant du sang en digestion, avec la partie apicale blanche du fait du développement des ovaires) et en femelles gravides (abdomen blanc et gonflé) (Mouchet *et al.*, 2004). La femelle n'est gravide que 36 à 48 heures après le repas du sang (Mouchet et Carnevale, 1991).

2.3.4. Comportement de reproduction

C'est au cours de la phase aérienne, le plus souvent dans un essaim, réunis au crépuscule, que les mâles et femelles s'accouplent. Pendant l'insémination des femelles, les spermatozoïdes introduits dans la bourse copulatrice migrent dans une spermathèque, sorte d'annexe du système sexuel femelle, dans laquelle ils sont stockés tout en conservant leur pouvoir fécondant, jusqu'à

la mort de la femelle (Bruce-Chwatt et De Julueta, 1985). C'est au cours de la ponte, lors du passage de l'ovocyte mûr dans le tractus génital de la femelle ou oviducte, qu'il est fécondé par les spermatozoïdes libérés à partir de la spermathèque.

2.3.5. La recherche du site de ponte et la ponte

Lorsque les ovocytes sont arrivés à maturité, la femelle se met en quête de gîtes favorables pour la ponte. Comme pour la recherche de l'hôte, des stimuli olfactifs sont perçus à distance par la femelle et lui permettent de les localiser. A courte distance, des caractéristiques physico-chimiques de l'eau peuvent influencer le choix du lieu de ponte. Généralement après le crépuscule la ponte est effectuée au cours de laquelle la femelle perche sur un support, libère les œuf à la surface de l'eau. Après la ponte l'anophèle part à la recherche d'un nouvel hôte pour prendre un autre repas de sang. Les femelles pares (c'est à dire qui ont déjà pondu au moins une fois), prennent généralement un repas de sang dans les heures qui suivent la ponte au cours de la même nuit (Rhodain et Perez, 1985; Gilles et Warrell, 1980).

Chaque ponte laisse des cicatrices dans l'ovaire. Un examen microscopique permet de séparer les femelles nullipares des femelles pares: les premières ont les extrémités des trachéoles des ovaires pelotonnées, alors que celle-ci sont déroulées chez les secondes. D'après la proportion de femelles pares et nullipares, il est possible d'établir la probabilité quotidienne de survie d'une population d'anophèles (Detinova, 1962; Cléments, 1992), et d'évaluer le succès d'une campagne de lutte antivectorielle.

2.3.6. Cycle d'agressivité

Les anophèles ont une activité de piqûre nocturne (du coucher au lever du soleil). Néanmoins, ils piquent également dans la journée du fait de leur grande capacité d'adaptation. C'est le cas de *An. gambiae s.s.* et *An. funestus* qui ont été observés piquant le jour dans des endroits obscurs (Mouchet et Carnevale, 1991). Certaines espèces piquent en début de nuit, mais la plupart des vecteurs majeurs piquent dans la deuxième moitié de la nuit, de 1 heure à 6 heures du matin. Par exemple, *An. gambiae s.l.* a son pic d'agressivité aux premières heures après minuit (Bregues et Coz, 1973 ; Robert *et al.*, 1988 ; Diabaté, 2003). Un certain nombre de spécimens, en particulier les femelles nullipares qui ne sont pas retardées par la ponte, piquent en début de nuit. L'heure de piqûre, comme tous les aspects du comportement des anophèles,

présente de grandes différences d'une population à l'autre, voire d'un individu à l'autre, d'un site à l'autre et même d'une saison à l'autre. Les anophèles qui se nourrissent sur l'homme sont dits anthropophiles et s'opposent à ceux dits zoophiles qui se nourrissent sur différentes espèces animales. On connaît quelques espèces strictement anthropophiles, comme *An. gambiae* s.s., dans la forêt afro-tropicale ainsi que *An. dirus* A et D dans les forêts d'Asie du Sud-Est. Plus fréquentes, sont les espèces strictement zoophiles, exclues de ce fait de la transmission. Cette différenciation n'est pas aussi nette dans la nature de sorte que de nombreuses espèces se nourrissent à la fois sur l'homme et sur le bétail, en fonction des disponibilités des hôtes, même si elles marquent une certaine préférence pour l'un ou pour l'autre. Les bases génétiques du comportement trophique ne sont pas encore clairement définies. Le repas de sang peut être pris dans la maison, on parle alors du comportement endophage ou à l'extérieur de l'habitation pour les anophèles exophages. Après leur repas de sang, certains anophèles restent dans la même maison pendant toute la durée du cycle gonotrophique: ils sont dits endophiles. Au contraire, d'autres espèces quittent rapidement les maisons pour gagner des refuges extérieurs: ils sont dits exophiles (Bregues et Coz, 1973 ; Mouchet *et al.*, 2004). A la température de 25°C, la durée de la phase pré-imaginale est d'une dizaine de jours pour *Anopheles gambiae* et d'une vingtaine pour *Anopheles funestus*. Cette phase s'allonge quand la température diminue et raccourcit quand elle augmente (cinq jours à 30°C pour *Anopheles gambiae*).

2.3.7. Notions de capacité et compétence vectorielles

La durée de vie moyenne des moustiques a d'importantes conséquences quant à leur efficacité en tant que vecteur: seulement un faible pourcentage des femelles de chaque population vit suffisamment longtemps pour être capable de transmettre le paludisme, c'est à dire suffisamment longtemps pour permettre le cycle sporogonique du *Plasmodium*, soit environ 10-14 jours. La technique de mesure de la parité est utile dans les programmes de lutte anti-vectorielle, puisque toute intervention efficace est susceptible de réduire la longévité des femelles. La capacité intrinsèque d'une espèce de moustique à assurer le cycle de l'agent pathogène (compétence) et à transmettre l'infection varient non seulement selon les espèces, mais aussi selon:

- la densité de vecteurs,
- le degré d'anthropophilie (attraction pour les humains)
- la fréquence de piquûre ou intervalle entre deux repas sanguins (2 jours en moyenne),

- la durée de vie du moustique (20 jours en moyenne),
- et la durée de sporogonie, temps allant du stade gamétocyte ingéré par le moustique au stade sporozoïte salivaire infectant (12 jours en moyenne).

La longévité des anophèles femelles adultes est d'une vingtaine de jours, guère plus d'un mois dans les conditions habituelles. Elle est plus réduite pour le mâle. Il est généralement admis que la mortalité des anophèles femelles n'est pas constante, mais qu'elle augmente avec l'âge, tout particulièrement après une vingtaine de jours de vie imaginaire pour *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* (Rhodain et Perez, 1985). La plupart des stratégies de lutte antivectorielle visent à réduire la durée de vie des femelles, au moins en dessous de la durée du cycle du développement du parasite.

2.3.8. Dispersion

La dispersion des *Anopheles* est variable selon le sexe et selon plusieurs modalités (exemple : dispersion active ou passive). Le phénomène de dispersion est relativement faible chez les mâles. Les femelles se dispersent régulièrement du fait de l'exigence de leur vie active (exigence trophique, exigence d'accouplement, et exigence de ponte). Selon le mode de dispersion passive, les distances parcourues sont en fonction du moyen de transport : vent, voiture, navire, avion ; tandis que la dispersion active par le vol est fonction non seulement des espèces et de leur âge, mais aussi des facteurs environnementaux et climatiques. La dispersion moyenne des anophèles adultes en vol à partir des gîtes larvaires est de l'ordre de 1km à 1,6km, pouvant atteindre 3 km selon la disponibilité des ressources que sont l'hôte, le lieu d'accouplement et le gîte de ponte. La distance de 7km est la limite maximale observée pour *Anopheles gambiae* (Gillies et De Meillon, 1968). Dans les zones tropicales, la croissance en nombre de la plupart des espèces de moustiques est continue tout au long de l'année, avec des variations saisonnières de densité liées aux conditions climatiques. Pendant la saison sèche, notamment au Sahel et au Sahara, ces conditions deviennent franchement défavorables, entraînant une disparition apparente des populations anophéliennes. L'estivation, état physiologique de dormance permettant une survie prolongée de l'adulte en saison chaude dans l'attente du retour de la saison des pluies, a été démontrée uniquement pour *Anopheles arabiensis* au Soudan (Gillies et De Meillon, 1968; Gillies et Coetzee, 1987).

2.4. La lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle est le complément indispensable de la lutte contre le paludisme. Le développement actuel de la résistance du *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques suscite un regain d'intérêt pour la lutte contre le vecteur, représentant la première méthode de prévention contre le paludisme. Elle est onéreuse et s'appuie directement ou indirectement sur des structures spécialisées (Mouchet *et al.*, 1991) et cible selon les stratégies le stade larvaire ou stade imaginal.

2.4.1. La lutte anti-larvaire

Elle peut s'envisager selon trois méthodes principales: Les modifications de l'environnement; les luttes physico-chimiques et les luttes biologiques.

2.4.1.1. La modification de l'environnement

Cette stratégie se réfère à toute mesure empêchant le développement des moustiques et vise à éliminer les gîtes larvaires ou les gîtes de repos. Ces mesures exigent parfois des investissements importants, au point que les municipalités manquent assez souvent de moyens pour s'y investir. Dans les pays en développement, les états soucieux de la relance de l'économie s'investissent dans les ouvrages de grande envergure qui créent souvent des conditions favorables au développement des vecteurs de maladies: système d'irrigation, drainage agricole, retenues d'eau à des fins diverses, maîtrise des eaux, constructions de grandes routes et de voies ferrées. Ainsi, il s'avère indispensable de prendre en compte les risques de multiplication des vecteurs avant de mettre sur pieds de grands ouvrages, ce qui est rarement réalisé. Par ailleurs, la modification de l'habitat, en vue de le rendre moins propice au développement des moustiques, est une méthode rarement couronnée de succès car il est difficile de localiser ou d'accéder et d'éliminer tous les gîtes larvaires et abris de repos existants.

2.4.1.2. Les luttes physico-chimiques

Elle consiste soit en un épandage d'un film d'huile minérale en surface des gîtes entraînant l'asphyxie des stades pré-imaginaux dont la respiration est aérienne (Mouchet, 1980), soit à verser dans l'eau des gîtes des insecticides toxiques pour des larves (larvicides). Ces méthodes

mêmes si elles sont souvent couronnées de succès ont le désavantage d'éliminer les insectes non cibles et de réduire ainsi la diversité des invertébrés aquatiques. Les régulateurs de croissance qui sont des analogues d'hormones d'insectes, tels que les juvénoides (méthoprène, pyriproxyfen) et les ecdysoïdes (diflubenzuron) sont des composés chimiques qui empêchent le développement des larves de moustiques en adultes. Leur usage est généralement limité à cause de leur coût élevé et des difficultés liées à l'accessibilité de certains gîtes larvaires. Ils peuvent être divisés en : analogues de l'hormone juvénile empêchant le développement des larves en pupes viables ou de la pupa à adulte et inhibiteurs de synthèse de la chitine qui interfèrent avec le processus de mue tuant les larves au cours de cette mue (Darriet, 1998).

2.4.1.3. Les luttes biologiques

Elles consistent à lutter contre les moustiques par l'entremise des agents biologiques. L'utilisation de poissons larvivores n'est envisageable que dans les cas des gîtes permanents. Le poisson larvivoire, *Gambusia affinis*, originaire d'Amérique du Nord, est utilisé dans la plupart des systèmes écologiques propices à son développement (Darriet, 1998 ; Meisch, 1985). Il existe de part le monde, 300 autres espèces recensées de poissons larvivores (Gerberich et Laird, 1968). Parmi les plus agressifs se distingue le guppy, *Poecilia reticulata* originaire de l'Amérique du Sud. *P. reticulata* est utilisé depuis plusieurs années dans les programmes de démoustication qui sont menés dans les îles de la Réunion et de Mayotte (Julvez *et al.*, 1987) et dans l'île de la grande Comore (Sabatinelli *et al.*, 1990).

En plus des poissons, les luttes biologiques peuvent aussi se faire à partir des bactéries du genre *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i.*) et *Bacillus sphaericus* (WHO., 1984) qui forment des spores en synthétisant des protéines toxiques dans l'estomac des larves de moustiques. Ces toxines entomo-pathogènes n'ont aucun effet par contact et ne deviennent efficaces que lorsqu'elles sont ingérées. Le *B.t.i.*, initialement utilisé en agriculture contre les insectes nuisibles des plantes, s'est révélé très actif contre de nombreuses espèces de moustiques (Barjac et Coz, 1979). Cependant l'activité résiduelle du *B.t.i.* est très courte (quelques jours) et son utilisation sur le terrain nécessite donc des applications répétées toutes les semaines.

Les protozoaires (*Nosema*), les champignons pathogènes (*Celomomyces*) et certains nématodes parasites sont présents dans la nature et peuvent être exploités pour lutter contre les vecteurs; ils n'ont eu qu'un usage restreint et éphémère (Baudon *et al.*, 1984). Quelle que soit la méthode utilisée, physique, chimique ou biologique, la lutte anti-larvaire est difficilement envisageable en milieu tropical du fait de la multiplicité des gîtes larvaires.

2.4.2. La lutte contre les adultes

2.4.2.1. La lutte chimique

La lutte chimique est basée sur l'utilisation des insecticides. Les insecticides les plus couramment utilisés appartiennent à trois grandes familles chimiques qui sont : Les organophosphorés; les carbamates et les pyrethrinoides. Ces insecticides agissent suivant différentes modalités : ingestion, inhalation, contact (Coosemans, 1978; Baudon *et al.*, 1984) ; Darriet, 1998). Ces insecticides sont utilisés en aspersion ou en imprégnation des rideaux, des moustiquaires. L'utilisation massive des moustiquaires imprégnées a permis de réduire la morbidité palustre (Corbel, 2002). Cependant, l'application continue d'insecticides à grande échelle entraîne non seulement des conséquences néfastes sur l'environnement (en raison de l'accumulation et la nocivité de ces produits chimiques), mais surtout l'émergence des cas de résistance, cause principale des échecs de luttes antivectorielles. Cependant, l'utilisation de moustiquaires imprégnées ou non d'insecticides ou de répulsifs, est le moyen qui semble le plus utilisé dans les pays en voie de développement pour empêcher le contact entre le vecteur et l'homme.

2.4.2.2. La lutte génétique

Le principe de la lutte génétique est basé sur la propagation, de génération en génération, de facteurs défavorables soit à la survie de l'espèce soit à sa capacité à transmettre le parasite. Par exemple, l'utilisation des mâles stérilisés par irradiation ou de substances chimiques a donné de bons résultats aux Etats-Unis et dans l'île de Curaçao sur la mouche parasite du bétail *Cochlyomya hominivorax* a connu un succès, en revanche, peu de succès avec les moustiques (Mouchet et Carnevale, 1991). En outre, une autre voie de lutte consiste à sélectionner dans des élevages des mâles hybrides issus cette fois de la multiplication de souches incompatibles d'origines géographiques distinctes. En 1967, une expérience le lâcher de mâles incapables d'inséminer les femelles dans un village de Birmanie a permis d'exterminer la population autochtone de *Culex pipiens fatigans* du fait de cette incompatibilité cytoplasmique (Zakharova, 1983).

Aujourd'hui, avec le séquençage complet du génome d'*An. gambiae*, l'utilisation des moustiques génétiquement modifiés rendus réfractaires aux *Plasmodium* par manipulation génétique, est devenue une possibilité de lutte. Cette stratégie génétique n'est plus basée sur l'élimination ou la réduction de la population du vecteur, mais plutôt sur la modification de sa

capacité à permettre le développement du parasite. L'objectif de cette stratégie est de lâcher les moustiques ainsi modifiés en espérant qu'ils pourront propager ensuite les gènes réfractaires dans les populations naturelles. Ceci exige non seulement que ces moustiques modifiés en laboratoire parviennent à survivre dans les conditions naturelles mais aussi qu'ils parviennent à s'accoupler avec leurs congénères naturelles.

Dans tous les cas, la mise en place ou l'utilisation d'une technique de lutte contre les vecteurs nécessite, non seulement une meilleure connaissance préalable des comportements des vecteurs dans leurs milieux naturels, mais aussi une prise en compte des variations des facteurs environnementaux.

3. METHODOLOGIES

3.1. Etude de terrain

3.1.1. Sites d'étude

L'étude a été conduite à Bama (La Vallée du Kou) et à Soumousso, deux villages situés à l'Ouest du Burkina Faso (Figure 2). La Vallée du Kou est située à une trentaine de kilomètres au Nord-Ouest de Bobo-Dioulasso (4°24'42'' de longitude Ouest et 11°23'14'' de latitude Nord), plus précisément sur une aire rizicole de 1200 ha, aménagée depuis les années 1970 et regroupant sept villages, dont la population est estimée à 8447 habitants (Diabaté, 2003). Deux cycles de riziculture y ont lieu par an : l'un en saison pluvieuse (Juillet à Novembre) et l'autre en saison sèche (Janvier à Juin). A cause de l'irrigation, les champs de riz sont des gîtes permanents très productifs en moustiques. Les dépressions remplies de flaques d'eau de pluies constituent également des gîtes larvaires additionnels. La transmission du paludisme à Bama est assurée par *An. gambiae* s.l. et accessoirement par *An. funestus*. La distribution des formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. est sujette à une dynamique spatio-temporelle avec une prédominance de la forme M toute la saison (Diabaté, 2003). La densité agressive est estimée à 200 piqûres par personne et par nuit.

Le second site de l'étude, Soumousso (4°03' W ; 11°04' N), est situé sur la route Bobo-Dioulasso-Diébouougou, à environ 55 km à l'Est de Bobo-Dioulasso. Les habitations sont situées à proximité d'un marécage temporaire et d'un petit ruisseau semi permanent, lesquels constituent des gîtes propices pour les larves de moustiques. D'autres gîtes temporaires sont également représentés par des flaques d'eau de pluie appropriées pour le développement des *Anopheles*. La saison pluvieuse s'étale de Mai à Octobre, avec une moyenne annuelle comprise entre 1000 mm et 1200 mm. Quatre espèces de moustiques vecteurs du paludisme sont rencontrées dans ce village, *An. gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. arabiensis*. Les deux formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. sont également rencontrées en sympatrie dans ce village avec une prédominance de la forme S toute l'année.

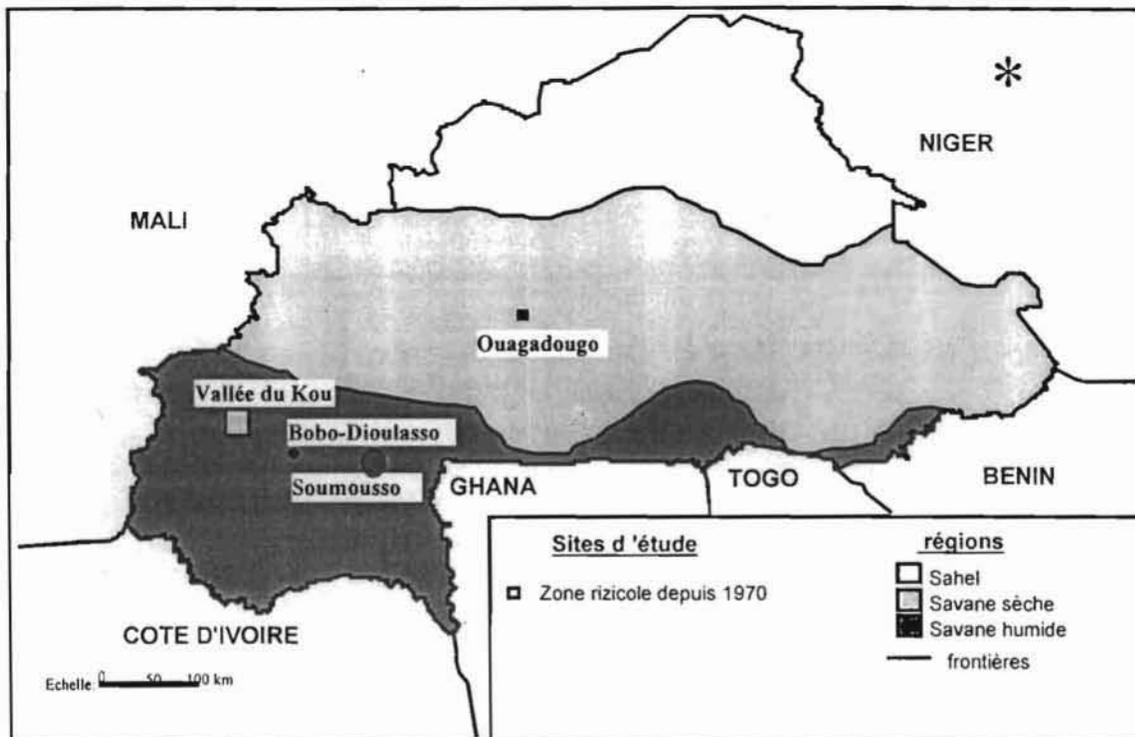


Figure 2 : Localisation des deux sites de l'étude, Vallée de Kou et Soumouso, Burkina Faso, 2007.

3.1.2. Echantillonnage des moustiques

La capture des moustiques a été faite sur les sites d'étude au moins une fois par mois (entre Mars et Octobre 2007) et suivant des jours et heures variables. Les moustiques ont été échantillonnés au niveau de leurs différents gîtes de repos à l'intérieur des habitations et maisons abandonnées puis à l'extérieur des habitations ; au niveau des gîtes larvaires et dans les essaims. En fonction des lieux de capture, la collecte des moustiques a été faite selon plusieurs techniques :

- Pièges lumineux CDC: Les moustiques, attirés par une source lumineuse alimentée par une batterie, ont été aspirés par une hélice tournante qui les refoule dans une cage en tulle. Les pièges ont été placés dans les concessions et à l'extérieur des concessions et ont permis la capture de femelles et mâles des moustiques.
- Capture Faunes Résiduelles : les moustiques des deux sexes ont été collectés manuellement sur leurs gîtes de repos dans les habitations à l'aide des tubes individuels ou des aspirateurs.

- Pulvérisation : des draps blancs ont été étalés au sol dans les habitations et après les portes et fenêtres bien fermées, un insecticide de type Kaltox fût appliqué pour foudroyer les moustiques présents. Après une dizaine de minutes, les moustiques, en majorité femelles, tombés sur les draps ont été collectés soigneusement.

- Essaim : à l'aide de filets-fauchoir, les moustiques, en majorité des mâles ont été fauchés dans les essaims formés et aspirés dans des cages.

Après chaque capture, les échantillons de moustiques collectés ont été placés dans des boîtes de Pétri bien étiquetées. Les moustiques du genre *Anopheles* ont été triés à l'aide de pinces et les espèces identifiées sous loupe binoculaire selon les clés de détermination morphologique (Gillies et De Meillon). Les spécimens, ainsi déterminés et identifiés ont été conservés au frais dans des glacières renfermant de la glace, puis transportés au laboratoire pour être analysés.

3.2. Dissection des moustiques

Les moustiques vivant ont été préalablement anesthésiés à la vapeur de chloroforme, puis placés individuellement sur lame dans une goutte de liquide physiologique avant d'être disséqués sous loupe binoculaire. A l'aide d'aiguilles de dissection, les spermathèques et les ovaires de femelles non gravides ont été dégagés du contenu stomacal puis examinés sous loupe et microscope optique pour les déterminations respectives de leur état d'insémination et de la parité (Detinova, 1962; Githeko *et al.*, 1994).. L'abdomen des mâles et des femelles (la carcasse et le reste du contenu stomacal des femelles à jeun, gorgées et gravides) a été utilisé pour le test de fructose ou cold Anthrone test (Clements, 1999). Le reste du corps (tête, thorax, ailes et pattes) est placé dans un microtube bien étiqueté contenant un dessiccateur (gel de silice) puis conservé à -20° C pour l'identification moléculaires des espèces du complexe d'*An. gambiae* et les formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. par PCR (Polymerase Chain Reaction) et ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Essay) pour l'analyse de l'origine du repas de sang, (Beier *et al.*, 1988).

3.2.1. Cold Anthrone test ou test de fructose

Le cold Anthrone test permet de mettre en évidence la présence du sucre végétal (fructose) chez les moustiques (Clements, 1999; Foster, 1995). En effet, des analyses chromatographiques ont montrées que le D-fructose était un constituant prédominant du nectar floral de toutes les plantes. Ce sucre ne se retrouve pas dans les tissus de l'animal et sa présence dans l'estomac du

moustique témoigne de la prise d'un dernier repas sur le nectar ou sucre végétal (Gary & Foster, 2004).

Deux étapes sont nécessaires pour la réalisation du Cold Anthrone test : La préparation du réactif et le dosage du fructose proprement dit:

3.2.1.1. Préparation du réactif

a. Matériel

- Poudre d'Anthrone
- Acide sulfurique concentré
- Eau distillée.

b. Procédure

- Préparer une solution d'acide sulfurique en versant 380 ml d'acide sulfurique concentré dans 150 ml d'eau distillée.
- Après faire dissoudre 150 mg de poudre d'Anthrone dans 100 ml de solution d'acide sulfurique (acide sulfurique dilué) ou 750 mg de poudre d'Anthrone dans toute la solution d'acide sulfurique préparé ci-dessus.

La solution d'Anthrone obtenue de couleur jaune citron est aussi appelée réactif de fructose (car spécifique au monosaccharide fructose ou à la terminaison fructose du disaccharide sucrose). Elle doit toujours être conservée au frigidaire (4°C).

3.2.1.2 Test de fructose

Lors de l'analyse, l'abdomen du moustique frais a été introduit dans un tube à essai posé sur un portoir et dans lequel on a ajouté 0.5ml de réactif d'Anthrone glacée (c'est-à-dire pris directement du réfrigérateur). L'abdomen du moustique a été écrasé à l'intérieur du tube à l'aide d'une baguette de verre. Ensuite l'homogénat de moustique a été incubé pendant 60 minutes à la température ambiante. Le test a été positif lorsque la couleur du réactif d'Anthrone change du jaune citron en vert clair, bleu ou en vert foncé dans le tube et les moustiques correspondants sont dits «positifs» témoignant qu'ils ont pris un récent repas de sucre végétal. L'absence de fructose a été marquée par la persistance de la couleur jaune citron dans les tubes et les moustiques correspondants ont été considérés «négatifs» pour décrire les spécimens n'ayant pas pris un récent repas de sucre.

3.2.2. Identification moléculaire par PCR

La méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour l'identification des formes moléculaires M et S en utilisant pâtes et ailles d'échantillons d'*Anopheles gambiae* s.s. cette technique permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique de l'ADN (acide desoxy-ribonucléique) afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter un trait génétique donné. La procédure utilisée est celle décrite par Favia *et al.* (2001):

- Deux à trois pattes de chaque échantillon ont été introduits dans un microtube de 0,2 ml dans lequel on ajoute 25 µl de mixte de réactifs PCR (Tableau I).
- La technique de Favia *et al.* (2001) fait intervenir quatre amorces (R3, R5, Mopint et B/Sint). R3 et R5 sont communes aux deux formes M et S de *An. gambiae* s.s., Mopint est spécifique à la forme moléculaire M et B/Sint est spécifique à la forme moléculaire S (les séquences des amorces et la composition volumétrique des réactifs (mixte PCR), Tampon 10X, MgCl₂, dNTP, Taq, H₂O sont présentés dans le Tableau I).

Tableau I : Conditions PCR avec la Taq Quiagen, pour un volume final de 25 µl par réaction

Réactifs	Concentration finale	Pour une réaction à 25 µl
Tampon de Taq 10 x contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1,5 mM	2,5 µl
MgCl 25 mM	1 mM	1,0 µl
5 mM dNTP	0,2 mM each	1,0 µl
Primer R3 (10 µM) R3: GCAATCCGAGCTGATAGCGC	7,5 pmoles	0,75 µl
Primer R5 (10 µM) R5: CGAATTCTAGGGAGCTCCAG	7,5 pmoles	0,75 µl
Primer Mopint (10 µM) Mop/int: GCCCCTTCCTCGATGGCAT	15 pmoles	1,5 µl
Primer B/S int (10 µM) B/S/int: ACCAAGATGGTTCGTTGC	15 pmoles	1,5 µl
Taq DNA poly (5 U/µl)	0,25 U	0,05 µl
ddH ₂ O		14,45 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1,5 µl

- Le programme d'amplification a été le suivant: 3 minutes à 94°C pour activer l'ADN polymérase, suivies de 28 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes pour fixation des amorces à 63°C et 45 secondes d'élongation à 72°C. Les produits de l'amplification ont été maintenus à 72°C, pendant 5 minutes pour extension.
- Les produits de l'amplification ont été ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. La migration a été effectuée à l'aide d'une cuve reliée à un générateur de 150 mV à 100 mA pendant au moins 1 heure.
- Un appareil photo approprié a permis de faire des photographies illustratives et permettant de visualiser sur un appareil à rayons ultraviolets les bandes correspondant aux formes moléculaires M et S.
- Les bandes typiques aux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* s.s. sont obtenus respectivement à 727 bp, et à 475 bp (Annexe :8.3).

3.2.3. Détermination de l'origine du repas de sang

Un échantillon de femelles d'anophèles gorgées de sang a été testé par ELISA pour déterminer l'origine de leurs repas de sang selon la technique Fontenille (d'après Beier, 1988), en recherchant en particulier la présence d'immunoglobulines (Ig) d'humain, de bœuf et de porc, Le protocole détaillé de préparation des réactifs pour l'ELISA est donné en annexe. Pour les analyses, nous avons procédé en résumé comme suit :

- Préparer les solutions de sang en découpant le spot de sang recueilli à partir de chaque moustique dans 0,8ml de PBS
- Sensibiliser les plaques en mettant 50ul de solution de sang à tester par puits (un moustique par colonne)
- Après lavage distribuer par puits 50ul de solution d'IgG marquées à la peroxydase
- Ajouter enfin après lavage, le substrat de la peroxydase
- Lecture des plaques après 30min à l'obscurité.

3.3. Analyse statistique des données

Les données ont été saisies sur ordinateur à l'aide du logiciel Excel 2000, converties et analysées avec Epi Info 3.3.2. Le test de Chi carré a été utilisé pour comparer les proportions entre différents groupes de moustiques. Les variations sont significatives pour $p < 0,05$.

4. RESULTATS

4.1. Caractérisation des échantillons d'anophèles capturés

Sur un total de 1663 moustiques capturés à la Vallée du Kou (Vk5 et Vk7) et à Soumouso, *Anopheles gambiae* s.l. était majoritairement représentée (95,36%) alors que les autres espèces dont *An. funestus*, *An. rufipes*, *An. coustani* et *An. pharoensis*, constituaient 4,64% de l'échantillon total (Tableau II). Le nombre de moustiques capturés était significativement plus élevé à la Vallée qu'à Soumouso ($\chi^2 = 213,8$; ddl = 8; $p < 0,05$) indépendamment des espèces concernées.

Tableau II : Répartition des espèces de moustiques collectés entre Mars et Octobre 2007 à la Vallée du Kou (VK5 et VK7) et à Soumouso.

Localité	Espèces					Total
	<i>An. gambiae</i>	<i>An. funestus</i>	<i>An. rufipes</i>	<i>An. coustani</i>	<i>An. pharoensis</i>	
Soumouso	311	54	6	0	0	371
VK5	563	0	0	2	1	566
VK7	712	0	3	6	5	726
Total	1586	54	9	8	6	1663

Les moustiques collectés ont été passés au test d'Anthrone pour détecter la présence de fructose dans leur estomac. Les variations de la fréquence de repas sucré chez les vecteurs ont été ensuite évaluées au niveau de chaque localité de l'étude, les différences entre les fréquences de repas sucré à Bamà (Vallée du Kou) et à Soumouso ont été recherchées.

4. 2. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction de la localité

Au total 1663 échantillons de moustiques provenant à la fois de la Vallée du Kou et Soumouso ont été analysés au test d'Anthrone (test de fructose). Sur les 1292 échantillons de la Vallée du Kou testés, 61,7% ont été positifs. Par contre sur les 371 échantillons de Soumouso, 65,5% ont présenté le sucre végétal (fructose) dans leur estomac. La différence de fréquence de

repas de sucre entre les moustiques capturés à la Vallée et ceux de Soumouso (Figure 3) n'a pas été statistiquement significative ($\chi^2 = 1,79$; ddl = 1; $p = 0,18$).

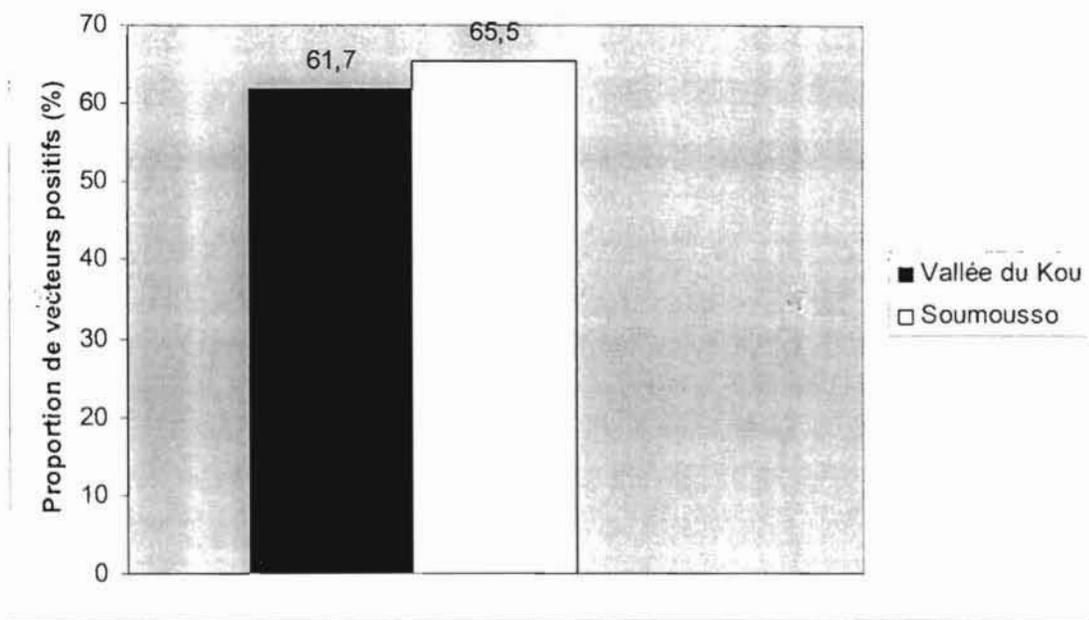


Figure 3 : Fréquence de repas sucré chez les vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumouso

4.3. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction du sexe des vecteurs dans les deux sites de l'étude.

A la Vallée du Kou, des 767 mâles et 525 femelles testés au fructose, respectivement 70,0% et 49,5% avaient pris un repas sucré, avec une proportion de positifs significativement plus élevée chez les mâles que chez les femelles ($\chi^2 = 55,3$; ddl = 1; $p < 0,05$). De même à Soumouso, plus de mâles (85,2%) que de femelles (40,1%) ont été positifs au test Anthrone sur un total de 209 mâles et 162 femelles analysés respectivement ($\chi^2 = 81,9$; ddl = 1; $p < 0,05$) (Figure 4).

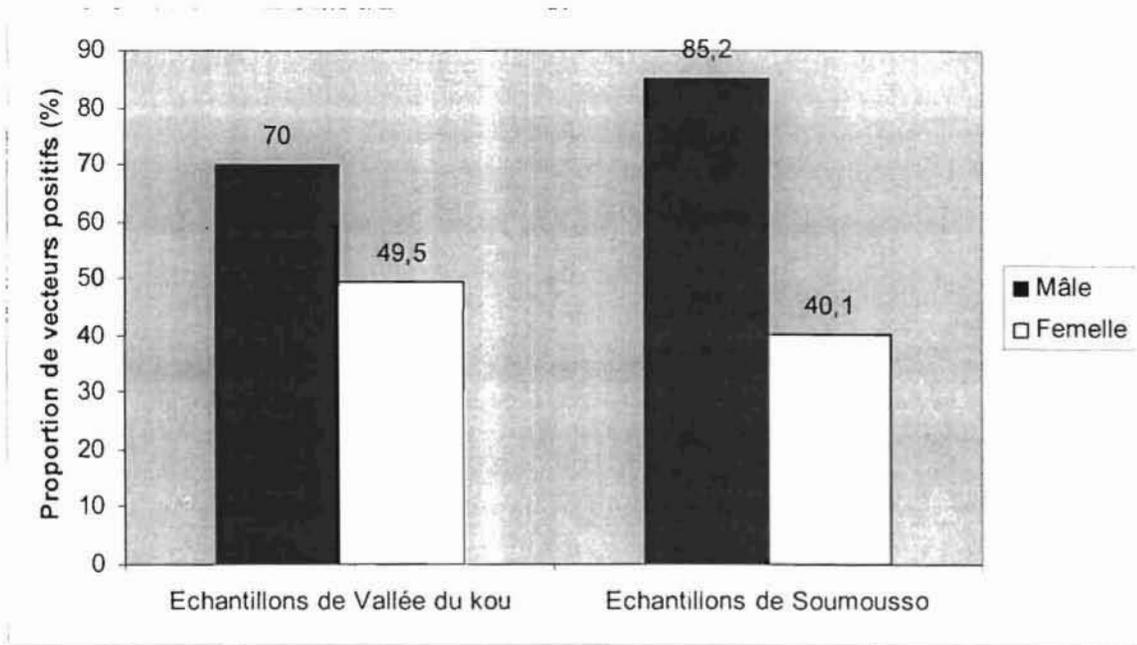


Figure 4 : Variation de repas sucré en fonction du sexe des anophèles à la Vallée du Kou et à Soumousso

4.4. Variation saisonnière de la fréquence de repas sucré chez les vecteurs.

A la Vallée du Kou, le test de fructose des 591 anophèles (notamment *Anopheles gambiae*) récoltés en saison des pluies et des 701 échantillons de saison sèche a montré que 63,80% et 59,90% des moustiques ont pris le sucre respectivement pendant la saison pluvieuse et en saison sèche (Figure 5). Quelle que soit la localité, la proportion de moustiques positifs en saison sèche n'était pas significativement différente de celle observée en saison pluvieuse ($\chi^2 = 2,04$; ddl = 1; $p = 0,15$). Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de période plus appétitive chez les moustiques, lesquels se nourrissent de sucre végétal quelle que soit la saison.

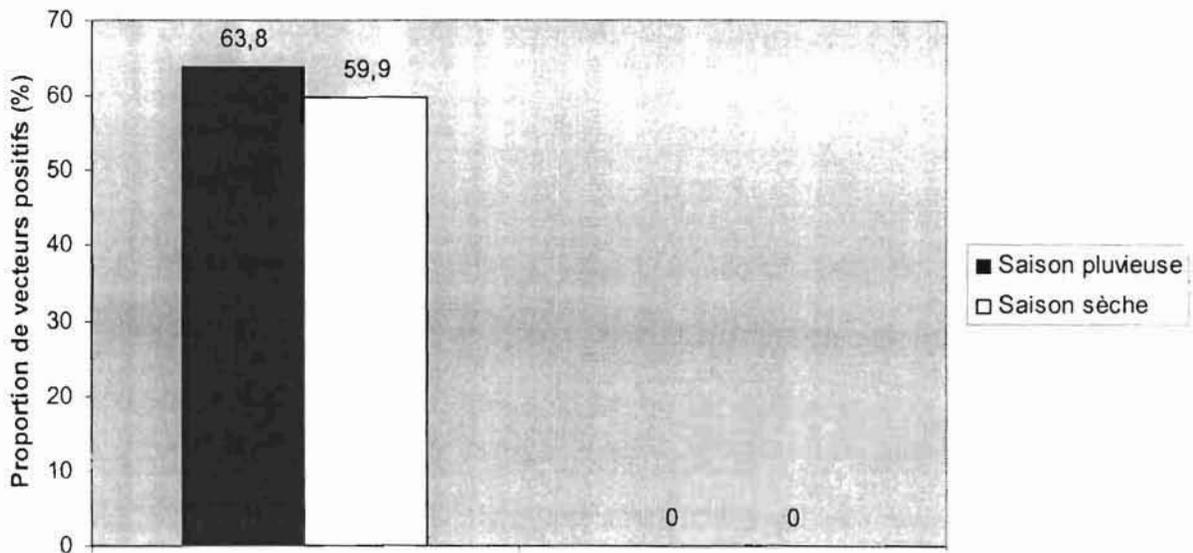


Figure 5 : Fréquences saisonnières de repas sucré chez les vecteurs à la Vallée du Kou

4.5. Fréquences de repas sucré chez les formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae* s.s.

L'analyse par PCR de 1059 échantillons d'*Anopheles gambiae* s.s. provenant de la Vallée du Kou, a donné 1054 formes M dont 59,0% avaient pris un repas sucré et 5 formes S dont 4 gorgés de sucre. Le test de Chi carré de Yates a montré qu'il n'existe aucune différence significative entre la fréquence de repas de sucre chez les formes M et S ($\chi^2 = 0,79$; ddl = 1; p = 0,37). A Soumouso un total de 110 *Anopheles gambiae* s.s. a été analysé. Sur un nombre de 49 formes M obtenues, 77,6% avaient pris un repas sucré contre 85,2% du total des formes S observées. Ici également nous n'avons pas observé de différence significative entre les proportions de moustiques positifs chez les formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae* s.s. ($\chi^2 = 1,08$; ddl = 1; p = 0,29) (Figure 6).

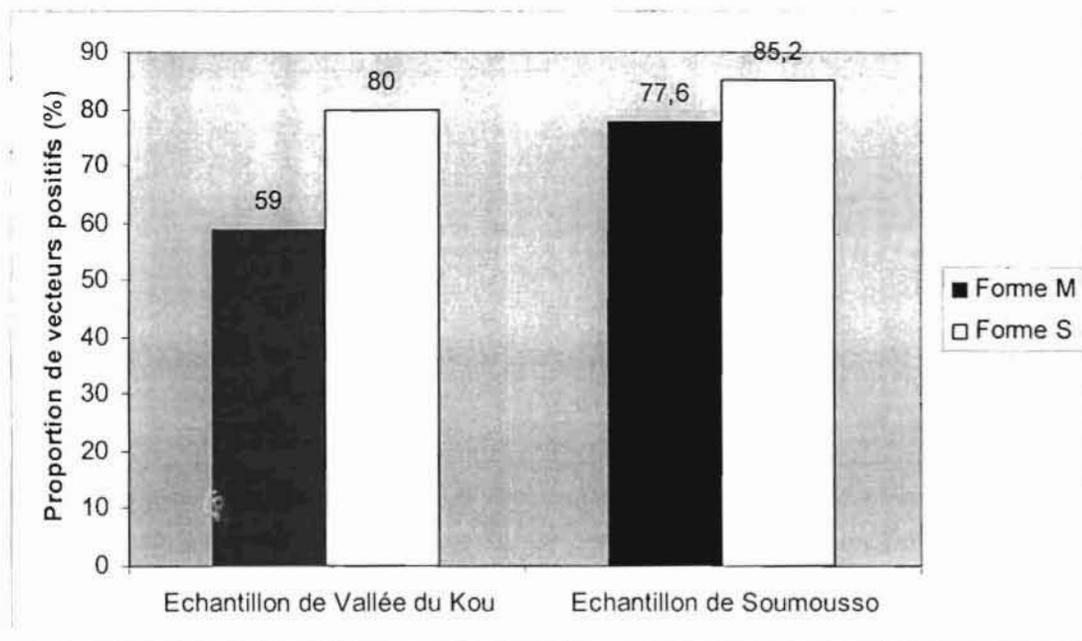


Figure 6 : Fréquences de repas sucré chez les formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae* s.s. à la Vallée du Kou et à Soumouso.

4.6. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction des statuts physiologiques des femelles d'anophèles

4.6.1. Influence de l'état d'insémination des femelles sur la fréquence de repas sucré

L'examen de l'état des spermathèques d'un échantillon de 525 femelles d'anophèles collectés à la Vallée du Kou a permis d'observer 262 femelles inséminées et 265 non inséminées. Suite au test d'Anthrone, 62,3% de femelles inséminées et 63,5% de femelles non inséminées avaient pris un repas de sucre, mais la différence entre les deux proportions n'étaient pas statistiquement significative ($\chi^2 = 0,07$; ddl=1; $p = 0,79$). A Soumouso sur les 162 échantillons de femelles observés, 47 étaient inséminées avec une fréquence de repas sucré de 72,3% contre 83,5% chez les 97 femelles non inséminées observées. Il n'a existé aucune grande différence entre la proportion de moustiques ayant pris un repas sucré chez les femelles inséminées et celles non inséminées ($\chi^2 = 2,94$; ddl = 1; $p = 0,08$) (Figure 7).

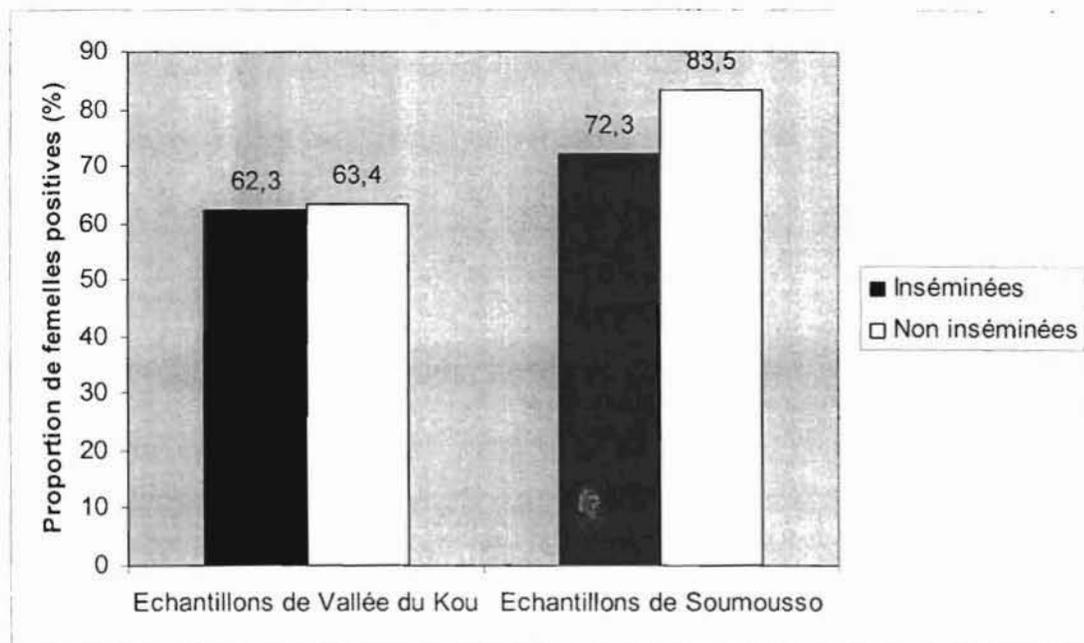


Figure 7 : Fréquences de repas sucré en fonction de l'état d'insémination des femelles des vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumoussou

4.6.2. Influence de l'état physiologique des femelles sur la fréquence de repas sucré

Nous avons échantillonné au total 285 femelles à jeun ou n'ayant pas de sang dans l'estomac, 137 femelles gorgées de sang et 103 femelles gravides à la Vallée du Kou. Respectivement, 50,9% à jeun, 47,4% gorgées et 48,5% gravides avaient été positifs au test de fructose indiquant des fréquences de repas sucré comparables entre les différents états physiologiques des femelles d'anophèles capturés à la Vallée du Kou ($\chi^2 = 0,49$; ddl = 2 ; p = 0,78). De même à Soumoussou, un total de 13 femelles à jeun, 39 femelles gorgées et 110 femelles gravides ont été analysées. Comme à la Vallée, il n'a pas été observé de différence significative entre les proportions de moustiques positifs au test de fructose chez les femelles à jeun (53,8%), gorgées (53,8%) et gravides (42,7%) ($\chi^2 = 1,76$; ddl = 2; p = 0,41) (Figure 8),

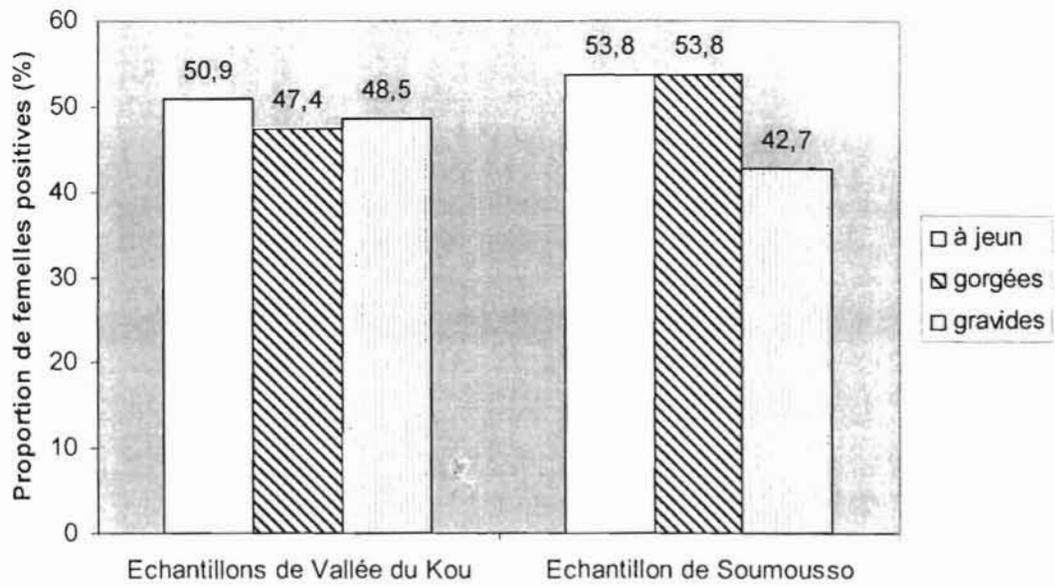


Figure 8 : Fréquence de repas sucré en fonction des états physiologiques des femelles des vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumoussou.

4.7. Influence des sources de repas sanguin sur la fréquence de repas sucré chez les femelles capturées gorgées de sang.

Globalement dans les deux localités, la proportion de femelles gorgées de sang a été relativement faible (Tableau III). Au total 21 échantillons sur 66 moustiques gorgés de sang analysés avaient montré un test de fructose positif, ceci indépendamment de l'hôte sur lequel ils s'étaient gorgés. Pour les femelles gorgées de sang humain, 25% et 33,3% avaient pris un récent repas sucré, respectivement à Vallée du Kou et à Soumoussou. Par contre respectivement 41,7% et 27,3% de femelles gorgées sur autres hôtes vertébrés ont été positifs au test de fructose (Tableau III). Ces résultats indiquent néanmoins que le sucre végétal est indispensable aux vecteurs quelle que soit leur tendance trophique vis-à-vis des hôtes vertébrés.

Tableau III : Relation entre fréquence de repas sucré et la tendance trophique vis-à-vis des hôtes vertébrés des femelles d'anophèles capturés à la Vallée du Kou et à Soumouso.

	Hôte	ELISA	Anthrone test
		Total n (%)	Positif n (%)
Vallée du Kou :	Homme	12 (0,18)	3 (25,0)
	Bœuf	2 (0,03)	0 (0,0)
	Porc	0 (0,0)	0 (0,0)
	Inconnu	12 (0,18)	5 (41,7)
	Mixte	6 (0,09)	2 (33,3)
Soumouso :	Homme	15 (0,23)	5 (33,3)
	Bœuf	1 (0,01)	1(100,0)
	Porc	1 (0,01)	1 (100,0)
	Inconnu	11 (0,17)	3 (27,3)
	Mixte	6 (0,09)	1 (16,7)

n = nombre de moustiques testés ; Mixte = Homme-Bœuf

4.8. Variation de la fréquence de repas sucré en fonction de l'âge physiologique des femelles d'anophèles

A la Vallée du Kou, sur les 310 femelles nullipares observées, 53,5% avaient pris un récent repas sucré contre 38,5% sur 111 femelles pares observées. Au total 27 femelles nullipares et 29 pares ont été observés à Soumouso avec des fréquences de repas sucré respectives de 66,7% et 44,8%. Statistiquement, la fréquence de repas sucré n'a pas varié en fonction de l'âge physiologique des vecteurs tant à la Vallée ($\chi^2 = 7,17$; ddl = 1 ; p = 0,07) qu'à Soumouso ($\chi^2 = 1,54$; ddl = 1, p = 0,21) (Figure 9).

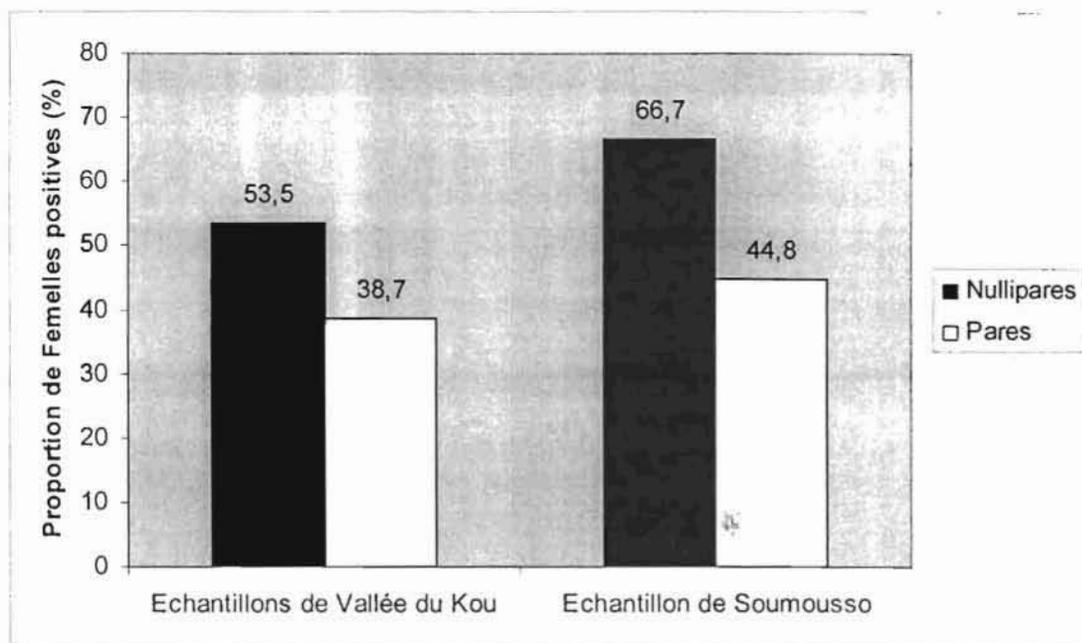


Figure 9 : Variation de repas sucré en fonction de l'âge physiologique des femelles des vecteurs à la Vallée du Kou et à Soumouso

5. DISCUSSION

Deux espèces vectrices majeures assurent la transmission du paludisme dans notre région d'étude avec une variation saisonnière marquée (Diabaté, 2003). Notre étude a confirmé que *Anopheles gambiae* s.l. est l'espèce la plus représentée tant à la Vallée qu'à Soumouso, suivi par *An. funestus* notamment dans la zone rizicole de la Vallée du Kou. Les densités de ces vecteurs semblent être fortement modulées par les caractéristiques écologiques des différents sites d'étude. Par la présente étude nous avons recueilli sur le terrain de nouveaux indices sur le comportement trophique des moustiques en relation avec les plantes. Ainsi un certain nombre de nouvelles observations sur les relations entre la fréquence de repas sucré (test d'Anthrone), l'état physiologique des moustiques, ou la variation saisonnière de la tendance « phytophage » des moustiques ont été faites et nous permettent maintenant de mieux rendre compte de l'importance des sucres végétaux sur la dynamique des vecteurs dans les zones étudiées. Compte tenu de l'objectif que nous nous sommes fixés, nous avons employé plusieurs modes de capture afin d'obtenir un échantillon représentatif de la population anophélienne suffisante pour nous donner une image instantanée mais objective de la proportion de moustiques ayant pris un repas sucré récent.

Tant à la Vallée du Kou qu'à Soumouso, nous avons pu montrer que les anophèles des deux sexes se nourrissent fréquemment de jus sucré ou de sécrétions des plantes. Les proportions plus élevées de mâles positifs au fructose par rapport aux femelles au niveau des deux localités pourraient être liées au fait que le repas de sucre constitue l'unique moyen d'alimentation pour les mâles (Foster, 1995). En plus du repas sanguin que les femelles peuvent obtenir à partir d'un éventail large d'hôtes vertébrés, elles peuvent aussi se nourrir du sucre des plantes. Ce résultat confirme bien que l'alimentation sucrée n'est pas un comportement facultatif chez les femelles de moustiques (O'Meara, 1987 ; Hancock et Foster, 1993, 1997; Foster, 1995). En effet, chez les femelles des espèces d'anophèles échantillonnées, l'alimentation sucrée débute peu après l'émergence (femelles nullipares), avant le premier repas de sang, et continuerait après le repas sanguin (femelles gravides) et pendant la maturation ovarienne et même après la ponte (femelles pares).

Les variations de la fréquence de repas sucré entre Soumouso et Bama (vallée de Kou) pourraient s'expliquer par le fait que ce comportement serait fortement influencé par les conditions écologiques du milieu. En effet le caractère rizicole de la Vallée du Kou marqué par des cultures irriguées rend possible, tout au long de l'année, l'existence de gîtes permanents de

moustiques et des végétations verdoyantes favorisant la plus ou moins disponibilité de sources de sucre aux moustiques. A Soumouso par contre, le taux relativement faible de femelles positives au fructose pourrait s'expliquer soit par une faible distribution des sources de sucre, ou par une grande disponibilité d'hôtes sanguins alternatifs tels que les porcs, veaux, chèvres. Par ailleurs la programmation de nos enquêtes a tenu compte de la dimension temporelle de l'alimentation sucrée. Les indices mensuels permettent d'établir une courbe évolutive de ce comportement au cours de l'année. Parce que la disponibilité de plantes fleurissantes (sources de nectar) pourrait éventuellement influencer le comportement des moustiques, on pourrait s'attendre à une variation significative de la fréquence de repas sucré dans le temps (Foster, 1995). En effet chez d'autres insectes tels que les Phlébotomes (vecteurs de Leishmaniose), la fréquence de l'alimentation sucrée peut varier énormément d'une période sur l'autre (du simple au quintuple) du fait même des variations climatiques et de la disponibilité des hôtes ou des sources de nectar (Hamilton & El Naiem, 2000). Les données obtenues à Soumouso ne permettent pas de vérifier cette hypothèse car nous n'avons pas pu faire des récoltes de moustiques en saison sèche, pour des raisons logistiques. Par ailleurs, à la Vallée du Kou 52,7% des repas de sucre observés chez les vecteurs étaient pris en saison sèche contre 47,3% en saison des pluies. Ceci confirme que les moustiques ont accès aux sources de sucre dans leurs habitats et ce quelle que soit la saison. La différence de fréquence de repas sucré observée entre les deux saisons, bien que statistiquement non significative, ne nous a pas permis de mettre en évidence une variation saisonnière de l'alimentation sucrée chez les vecteurs étudiés. Probablement, il ne semble pas avoir de période(s) plus appétitive(s), du moins où la prise de repas sucré est plus marquée chez les moustiques.

Au sein de notre population anophélienne, constituée essentiellement d'*An. gambiae* s.s., nous avons noté qu'il n'existerait aucune différence vraisemblable entre la fréquence de repas sucré chez les formes M et celle chez les formes S de cette espèce. Les différences ont été apparentes mais elles n'ont pas été statistiquement significatives. En dépit de la faible taille des échantillons examinés l'expression du besoin en sucre ne serait donc probablement pas liée aux caractéristiques génétiques différenciant les deux formes moléculaires d'*An. gambiae* s.s. qu'on retrouve parfois en sympatrie tant à Bama qu'à Soumouso.

Les femelles d'anophèles s'alimenteraient de sucre végétal à tous les stades physiologiques de vie (MacCrae et al., 1976). Ceci a été confirmé par les résultats obtenus dans chacune de nos deux sites d'étude. En effet, au niveau des deux localités, en moyenne 50% des femelles de chaque état physiologique (à jeun, gorgé et gravide) ont été positives au fructose. Ces résultats suggèrent que les anophèles auraient la même chance de s'alimenter sur le sucre quel que soit

leur statut physiologique. Les femelles auraient besoin de sucre non seulement pour assurer leur survie mais aussi pour satisfaire les besoins d'énergie nécessaire aux efforts de recherche d'hôtes sanguins, de lieu d'accouplement ou de gîtes adéquats pour la ponte des œufs. La prise de repas sucré permettrait en outre d'accroître l'espérance de vie des moustiques. Notre étude n'a pas permis de déterminer la valeur ou la signification de l'alimentation sucrée au cours des différentes phases de vie des anophèles. Parallèlement, les femelles gorgées de sang pourraient aussi avoir besoin de sucre même en ayant accès au sang sur différents hôtes vertébrés tels que Bœuf, Porc, Homme et même des repas mixtes sur Homme et Bœuf ont été observés. Nous ignorons pour l'instant la séquence chronologique de ces deux types de comportement dans la vie des anophèles. Cependant ces résultats prouvent que les sources de sucre ne sont pas plus attractives que des sources de sang aux femelles aux instants spécifiques dans leur vie, mais que l'alimentation de sucre est habituellement nécessaire et plus fréquente que l'alimentation sanguine (Walker, 1997).

Il a été montré que les femelles, à l'émergence chercheraient à se procurer d'abord d'un repas de sucre avant de se lancer à la recherche d'hôtes sanguins (Hancock et Foster, 1993, Foster, 1995); cependant la disponibilité et la proximité d'une part des ressources végétales et d'autre part des hôtes vertébrés, pourraient influencer de façon non négligeable le comportement trophique des vecteurs (Gary et Foster, 2001; Okech et *al.*, 2003; Impoinvil et *al.*, 2004). On note effectivement que plus de la moitié des femelles nullipares ont été positives au fructose au niveau de chaque localité, ce qui n'a pas été le cas pour les femelles pares même si cette différence apparente n'a pas été statistiquement significative. Nous pensons que les moustiques seraient obligés de prendre un repas sucré à l'émergence, et ce d'autant plus facilement qu'ils se retrouveraient directement en face de végétations présentes dans les environs immédiats des gîtes et qui leur serviraient à la fois d'abris et de source de nectar. Alors que les femelles pares ont besoin de sucre entre deux repas sanguins pour compenser les pertes d'énergie survenues lors de la recherche d'hôtes ou lors de la ponte.

Aucune variation significative ($p > 0,05$) de la tendance d'alimentation sucrée n'a été observée entre les femelles inséminées et celle qui ne l'étaient pas, aussi bien à la Vallée du Kou qu'à Soumousso. Ces résultats suggèrent que les vecteurs pourraient se nourrir de sucre aussi bien avant l'accouplement qu'après insémination. D'une part, l'insuffisance des réserves énergétiques accumulées à l'état larvaire pourrait conduire les femelles néonates à se nourrir de sucre avant de chercher à s'accoupler; d'autre part, le temps, trop long, mis à la recherche d'essaims adéquats de mâles pour leur accouplement pourrait pousser les jeunes femelles à prendre au passage, un repas de sucre pour compenser les dépenses énergétiques. Ces résultats

prouvent également que si les femelles vont s'accoupler et se nourrir ensuite (mais pas exclusivement) par la prise régulière d'un repas de sang, le sucre végétal reste la seule source d'énergie utile (Foster, 1995 ; El-Akad, 1989).

En définitive notre étude tout comme la plupart des connaissances acquises sur ce comportement trophique des moustiques (Youval, 1992 ; Gary et Foster, 2001, 2004) montre que le sucre des plantes constitue la première source de nourriture à laquelle ont accès bon nombre d'espèces de moustiques après leur émergence et c'est par ce biais que les jeunes adultes, mâles et femelles, vont obtenir l'énergie nécessaire pour leur permettre d'effectuer les premières étapes de leur vie d'adulte (vol, essaimage, reproduction). Les moustiques adultes peuvent obtenir du sucre à partir des nectars floral et extra-floral, du miel, de la sève des plantes et des fruits pourris et abandonnés (Bowen, 1992; Youval et *al.*, 1994 ; Foster, 1995; Holliday-Hanson et *al.*, 1997). C'est probablement la disponibilité dans l'environnement mais aussi et surtout la « qualité » du sucre prélevée par le moustique qui va orienter le choix vers la source de sucre préférée. Les déterminants de ce choix, sa spécificité, ou la dépendance des principales espèces d'anophèles pour différentes plantes hôtes restent largement inexplorés. Une question de base reste aujourd'hui encore sans réponse : Quelles sont les sources de sucre sur lesquelles s'alimenteraient préférentiellement les principaux vecteurs de paludisme africains ?

Notre travail apporte une contribution à la prise en compte de nouveaux paramètres comportementaux et à mieux comprendre les interactions des moustiques vecteurs avec leur environnement naturel. Nos résultats confirment qu'en dépit de leur importance primordiale pour la survie et le développement de ces vecteurs de maladies, tant à l'échelle individuelle que populationnelle, les interactions moustiques-plantes en particulier, restent très mal connues et peu étudiées ou comprises. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués et de leurs déterminants biologiques pourrait déboucher sur la mise au point de méthodes de contrôle spécifiques et innovantes.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les principaux résultats obtenus montrent que les adultes des anophèles se nourrissent fréquemment de sucre végétal aussi bien à Soumousso qu'à la Vallée du Kou (Bama). Bien que le sucre constitue le seul aliment des mâles, il s'avère être aussi une source alimentaire fondamentale pour les femelles même lorsqu'elles ont accès aux sources de sang. En effet au niveau des deux sites d'étude, les femelles des vecteurs s'alimentent de sucre quels que soient la saison, leurs statuts et âge physiologiques avec de faibles variations liées à la fois et selon le cas, à leurs états de réplétion et surtout à la disponibilité ou non des ressources végétales de sucre.

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence un aspect important du comportement trophique des vecteurs de paludisme dans leur environnement naturel et de se rendre compte que toutes les espèces des vecteurs ont besoin de sucre végétal pour satisfaire surtout leurs besoins énergétiques. Ces résultats permettront d'entreprendre divers aspects d'études plus élaborés sur ce comportement trophique des vecteurs. Ces études supplémentaires pourraient à terme permettre la mise en place de nouvelles stratégies efficaces de lutte contre les vecteurs du paludisme. IL serait donc nécessaire à cet effet, dans chacune de nos deux localités d'étude, d'identifier les sources potentielles de sucre et de déterminer l'effet des substrats végétaux sur différents traits de vie tels que la longévité, la fécondité, la dispersion de ces moustiques dans leurs habitats et d'évaluer l'effet de ce comportement trophique sur les interactions vecteurs-parasites.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Annuaire statistique du ministère de la sante du Burkina Faso. 2002.

Adja A.M., N’Goran K.E., Kengne P., Koudou G.B., Toure M., Koffi A.A., Tia E., Fontenille D., Chandre F. (2006). Transmission vectorielle du paludisme en savane arborée à Gansé en Côte d’Ivoire. *Med Trop* ; **66** : 449-455.

Barjac H. Et Coz J., (1979). Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Bull. WHO*, **57**: 139-141.

Baudon, D., Robert V., Boudin C., Carnevale, P. & Gazin P., (1984). Moyens de lutte antipaludéenne. In : *les paludismes en Afrique Inter tropicale. Etude médicale. 2^{ème} partie*, N° 3: 147-165.

Beier Jc, Perkins Pv, Wirtz Ra, Koros J, Diggs D et al.,(1988). Blood meal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.* **25**, 9-16.

Beier J.C. (1996). Frequent blood-feeding and restrictive sugar-feeding behavior enhance the malaria vector potential of *Anopheles gambiae* s.l. and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J. Med. Entomol.* **33**: 613-618.

Beier J.C. (2000) The potential impact of integrated malaria transmission control on entomologic inoculation rate in highly endemic areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 545–51.

Beier J.C., Perkins P.V., Wirtz R.A., Koros J., Diggs D. et al., (1988). Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tested on *Anopheles* (Diptera : Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.* **25**, 9-16.

Boreham P.F. (1975). Some application of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *J. Trop. Med. Hyg.* **78**: 83-91.

Bowen M.F. (1992) Patterns of sugar-feeding in diapausing and nondiapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) females. *J. Med. Entomol.* **29**, 843–849.

Brengues J. & Coz J. (1973). Quelques aspects fondamentaux de la biologie d’*Anopheles gambiae* Gilles (Sp.A.) et *Anopheles funestus* Gilles, en zone de savane humide d’Afrique de l’Ouest. *Cahier ORSTOM. Sér. Ent. méd. et Parasitol.*, **11**(2), 107-126.

Brooke B.D., Hunt R.H. & Coetzee M. (2000). Resistance to dieldrin +fipronil assortis with chromosome inversion 2La in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* **14**: 190-4

- Bruce-Chwatt L.J. & De Zulueta J.**, (1985). *Essential Malariology*. W. Heinemann med. Books Ltd, London, chap., 8: 166-209.
- Chandre F., Manguin S., Brengues C. et Coll.**,(1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parasitologia*. **41**: 319- 322.
- Charlwood J.D., Thompson R. & Madsen H.**, (2003). Observations on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* from southern Mozambique. *Malaria Journal*. **2**: 2.
- Clements A.N.** (1992). *The biology of mosquitoes*. London: Chapman & all. 509p
- Clements A.N.** (1999). *The Biology of Mosquitoes*, Vol. 2. *Sensory Reception and Behaviour* . CABI Publishing , U.K .
- Coluzzi M., Petrarca V., & Di Deco M.A.**, (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di Zoologia*. **52**: 45–63.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V. & Di Deco M.A.**, (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **73**: 483–497.
- Coluzzi M., Sabatini A., Della Torre A., Di Deco M.A., & Petrarca V.**, 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* complex. *Science*, **298**: 1415-1418.
- Coosemans M.**, (1978). Lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique tropicale. *Méd. Trop.*, **38** (6): 679–684.
- Corbel V., Darriet F. Chandre F. & Hougard Jm.** (2002). Insecticide mixture for mosquito net impregnation against malaria vectors, *Parasite*, n°9, pp. 255-259.
- Costantini C., Sagnon N., Ilboudo-Sanogo E. et Coll.**, (1999). Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*. **41**: 595- 61
- Dia I., Diop T., Rakotoarivony I., Kengne P., Fontenille D.** (2003) -Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An .nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean Zone (Ngari , Senegal). *J. Med. Entomol.* **40**: 279-83.
- Diabate A.** (2003). *Le paludisme au Burkina Faso : étude de la transmission et répartition géographique de la résistance d'Anopheles gambiae s.l. au pyrethrinoides*. Thèse, université de Montpellier II, 123p.
- Darriet F.**, (1998). *La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies*. Editions Karthala, ISBN (Karthala) : 2-86537-864-0 ; ISBN (ORSTOM) : 2-7099-1367-4, Xp.

- Della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-Yovo J., Favia G., Petrarca V. & Coluzzi M.**, (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Ins. Mol. Biol.*, **10**: 9-18.
- Detinova T.S.**, (1962). Age grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria. *Org. Mond. Santé, sér. Monogr.* **47**: 216p.
- Detinova T.S.**, (1963). Méthode à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale. *Org. Mond. Santé, sér. Monogr.*, **47**: 220 p.
- Favia G., Torre A D., Bagayo Ko M. et Coll.**,(1997). Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Ins. Mol. Biol.*, **6**: 377- 383.
- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sidén-Kiamos I., Louis C.** (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Ins. Mol. Biol.*, **10**, 19-23.
- Fontenille D., Lepers JP., Campbell GH., Coluzzi M., Rakotoarinony I. & Coulanges P.** (1990). Malaria transmission and vector biology in Manarintso a High Plateaux of Madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**, 107-115.
- Fontenille D., Campbell GH.** (1992). Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar ? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46** : 28- 30.
- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene PH. et Coll.**, (2003). Systématique et biologie des anophèles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique : données récentes. *Med Trop.* **63**: 247-53.
- Foster W.A.** (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *An. Rev. Entomol.* **40**: 443-474 .
- Garett-Jones C., Boreham F.L., & Pant C.P.**, (1980). Feeding habits of anophelines (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* **70**: 165-185.
- Gary R.E. Jr. & Foster W.A.**, (2001). Effects of available sugar on reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Dipteria : Culicidae). *J. Med. Entomol.* **38**: 22-28.
- Gary R.E. Jr. & Foster W.A.**, (2004) *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of Peridomestic plants. *Med. Vet. Entomol.*, **18**: 102-107.
- Gerberich J.B. & Laird M.**, (1968), Bibliography of papers relating to the control of mosquitoes by the use of fish. An annotated bibliography for the years 1901-1966. *FAO Fisheries Tech., paper 75. FRS/T 75*: 1-70.

- Gillies M.T. & De Meillon B.**, (1968). The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical region). *The South Afr. Inst. Med. Res.* Johannesburg, 2nd Ed. 343p.
- Gilles H.M., & Warrell D.A.**, (1980). Bruce-Chwatt's essential malariology Edward Arnold.
- Gillies M.T. & Coetzee M.C.**, (1987). A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *Publ. South Afr. Inst. Med. Res.*, Johannesburg, n° 55, 143p.
- Githeko A.K., Service M.W., Mbogo C.M., Atieli F.K. & Juma F.O.** (1994). Origin of bloodmeals in indoor and outdoor resting malaria vectors in western Kenya. *Acta Trop.* 58:307-316.
- Gwadz R. & Collins F.H.**, (1996). Anopheline mosquitoes and the agents they transmit (73-84). In: *the biology of disease vectors*. Beaty B.J. & Marquardt W.C. (eds). University Press of Colorado, 632p.
- Hamilton, J. G. C. & El Naiem, D. A.** (2000). Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. *Med. Vet. Entomol.*, 14: 64-70.
- Hancock R.G. & Foster W.A.** (1993). Effects of preblood-meal sugar on sugar seeking and upwind flight by gravid and parous *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 30:353-359.
- Hancock R.G. & Foster W.A.** (1997). Larval and adult nutrition effects on blood/nectar choice of *Culex nigripalpus* mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.*, 11:112-122.
- Hunt R.H., Coetzee M. & Fittene M.**, (1998). The *Anopheles gambiae* complex: new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92: 231-235.
- Holliday-Hanson M.L., Youval B. & Washino R.K.** (1997). Energetics and sugar-feeding of field-collected anopheline females. *J. Vect. Ecol.*, 22:83-89.
- Impoinvil D.E., Kongere J.O., Foster W.A. et al.** (2004). Feeding and survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* on plants growing in Kenya. *Med. Vet. Entomol.*, 18:108-115.
- Julvez J., Galtier J., Ali Halidi M.A., Herry M., & Mouchet J.**, (1987). Epidémiologie du paludisme et lutte antipaludique à Mayotte, archipel des Comores. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 80: 505-519.
- Killen G.F., McKenzie F.E., Foy B.D., Schieffelin C., Billingsley P.F. & Rodhain F. & Perez C.**, (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, éditeur Maloine S.A Paris, France 485 pp.
- Kulkarni S.M. & Panda P.**, 1984. Two cases of malaria by split feeding of a naturally infected mosquito. *Ind. J. Malariol.*, 21: 293-294.

- Lindsay S.W. and Armstrong J.R.M.** (1993). Human attractiveness to mosquitoes. *J. Med. Entomol.* **30**(2) 368-373.
- MacDonald G.** 1957. The epidemiology and control of malaria. Oxf. Univ Press ed, Londres, 201 p.
- Manda H., Gouagna L.C., Nyandat E., Kabiru E.W., Jackson R.R., Foster W.A., Githure J.I., Beier Jc. and Hassanali A.** (2007). Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae s.s.* on endemic plants in western Kenya. *Med. Vet. Entomol.* **21**:103–111
- Manguin S., Fontenille D. & Chandre F.,** (1999). Génétique des populations anophéliennes. *Bull. Soc. Pathol. Exot.,* **92**(4): 229–35.
- Coetzee M.C.,** (1987). A supplement to the Anophelinae of Africa south of the sahara (Afrotropical region). *Publ. South Afr. Inst. Med. Res.,* Johannesburg, n° **55**, 143p.
- Mbogo C.N.M., Kabiru E.W., Muiruri S.K., Nzovu J.M., Ouma J.H., Githure J.I. and Beier J.C.** (1996). Bloodfeeding behaviour of *Anopheles gambiae s.l.* and *Anopheles funestus* in Kilifi district, Kenya. *J. Am. Mosq. Control Assoc., Inc.* **9**(2) 225-228.
- McCrae A.W.R., Boreham P.F.L. & Ssenkubuge Y.** (1976). The behavioral ecology of host selection in *Anopheles implexus* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.,* **66**:587–631.
- Meisch M.V.,** 1985. *Gambusia affinis affinis*. Biological control of mosquitos. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.,* **6**: 3-17.
- Mouchet J.,** (1980). Lutte contre les vecteurs et nuisance en santé publique. *Encycl. Méd. Chir.* Paris, Maladies infectieuses, 8120 B10.
- Mouchet J., Robert V., & Carnevale P.,** (1991). Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale : Place et limite de la lutte antivectorielle. *Cahier Santé,* **1**: 277–288.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D. & Sircoulon J.,** (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. Editions John Libbey Eurotex, ISBN 2-7420-0452-1, 428p.
- Okech B.A., Gouagna L.C., Knols B.G.J. et al.** (2003) Influence of sugar availability and indoor microclimate on survival of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) under semi field conditions in western Kenya. *J. Med. Entomol.,* **40**:657–663.
- O'Meara, G.F.** (1987) Nutritional ecology of blood feeding Diptera. *Nutritional. Ecology of Insects, Mites and Spiders* (Ed. by F. Slansky, Jr and K. G. Rodriguez), pp. 741–764. John Wiley and Sons, New York.
- Rezendaal J.A.,** (1999). *La lutte antivectorielle. Méthodes à usage individuelles et communautaires.* OMS/Genève, ISBN 9242544949, 449p

- Robert V., Petrarca V., Carnevale P., Ovazza L. & Colluzzi M.**, (1989). Analyse cytogénétique du complexe *Anopheles gambiae* dans la région de Bobo Dioulasso (Burkina Faso). *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, **64**: 290-311
- Robert V., Ouary B., Ouedraogo V. & Carnevale P.**, (1988). La succession des espèces anophéliennes et le cycle du riz ; étude écologique des *Culicidae* adultes et larvaires dans la rizière de la vallée du Kou, Burkina Faso. *Acta. Trop.*, **45** : 351-359.
- Rodhain F. et Perez C.**, (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, éditeur Maloine S.A Paris, France 485 pp.
- Sabatinelli G., Majori G., Blanchy S., Fayaerts P.H. & Papakay M.**, (1990). Expérimentation du poisson larvifère *Poecilia reticulata* dans la lutte contre le paludisme en RFI des Comores. *Doc. mimeo. OMS, WHO/MAL/90.1060* : 10p.
- Schlein, Y. & Müller, G.** (1995) Assessment of plant tissue feeding by sand flies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, **32**:882–887.
- Schlein, Y. & Müller, G.** (2005). Plant tissues: the frugal diet of mosquitoes in adverse conditions. *Med. Vet. Entomol.* **19**:413–422.
- Service M.W.** 1980. *A Guide to Medical Entomology*, p. 44 . The Macmillan Press
- Touré Y.T., Petrarca V., Traoré S.F., Coulibaly A., Maïga H.M., Sankaré O., Sow M., Di Deco M.A. & Coluzzi M.**, (1998). The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognised taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia*, **40**, 477-511.
- Walker, G.** (1997). The Ethology of *Anopheles gambiae*, the vector of malaria. *Insect Behavior Review* **51I** : 3-12.
- White G.B.** 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**: 278–298
- WHO**, 1984. Report of the seventh meeting of the scientist working group on biological control of vector. *Mimeogr. Doc. TDR/BCV/SWG*, **84**(3), 33p.
- WHO** (1998). Comité d'experts du paludisme. Vingtième rapport. [http:// www. Mosquito. who.int / docs /ocr 20 fr.htm](http://www.who.int/docs/ocr/20fr.htm)
- WHO** (2005). World malaria Report. *RBM/WHO/UNICEF, Geneva*, 120p.
- Wilkes TJ., Matola YG., Charlwood JD.** 1996. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med. Vet. Entomol.* **10**: 108- 110.
- Yuval B.** (1992). The other habit : sugar feeding by mosquitoes. *Bull. Soc Vector Ecol.* **17**: 150-56.

Youval B., Holliday-Hanson M.L. & Washino R.K. (1994) Energy budget of swarming male mosquitoes. *Ecol. Entomol.*, **19**:74–78.

Zakharova N., (1983). La méthodologie moderne de la lutte génétique contre les moustiques. La lutte contre le paludisme. Les méthodes écologiquement rationnelles de lutte contre le paludisme et ses vecteurs. Tome 2. La lutte antivectorielle et la protection de l'environnement. *Éd. MIR* : 161-175.

8. ANNEXE

8.1. Préparation du gel d'agarose

- Dissoudre dans un Erlenmeyer, 1,5 g de poudre d'agarose dans 100 ml de tampon T.B.E. 1 M.
- Chauffer le mélange à 75°C dans un four à micro-ondes pendant 1 min 30 sec. Refroidir le gel à environ 45°C puis on y ajoute 3 µl de Bromure d'éthidium.
- Couler ensuite le gel dans un bac à électrophorèse contenant des peignes puis laisser sur la paillasse pendant Au moins 15 à 30minutes.

8.2. Protocoles de biologie moléculaire à l'usage des stagiaires et des étudiants.

ELISA REPAS DE SANG

DF, janv 2003

Technique Fontenille D., d'après Beier JC et *al.* (et Sarthou pour la coloration) Fev 2002. LIN

01 -Préparer le **Tampon " Repas de sang "** (à garder à +4° C, 1 à 2 semaines)

Pour 1/ 2 litre : -2.5g de caséine dans 50 ml de NaOH 0,1N :

Faire bouillir jusqu'à totale dissolution

-ajouter 450 ml de PBS

-ajouter 0,025% Tween 20 (soit 125 µl/1/2 l)

-ajouter 0,05 g Thiomerosal

-ajouter 0,01 g Phenol rouge

Agiter 2 h

-Préparer le **Tampon Citrate pH4 :**

Pour **1 litre :**

Acide citrique, 1 H₂O 11,77g

Hydroxyde de Sodium 4,48g

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

02 -Avec **SP OTS** (confetti sur papier filtre)

*Découper le spot, le mettre env. dans 0,8ml de PBS (selon la quantité probable de sang)

*Vortexer 1 ou 2 fois

*Laisser au moins 1h

-Avec **ABDOMENS COUPES**

*Broyer dans 250ul de PBS

*Ajouter environ 750ul de PBS

03 -Préparer les **témoins positifs** : sang dilué au 1/100 en moyenne
10ul de sérum d'espèce dans 1ml de PBS (homme (1/100), bœuf (1/100), mouton (1/30), porc (1/100))

04 -**Sensibiliser les plaques**

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

05 -**Incubation 3h** à la température de la pièce ou la nuit à +4°C

06 -**Préparer les anticorps** spécifiques d'espèces **marqués** à la peroxydase: reconstituer les IgG marquées selon la notice. Garder au congélateur.

Pour **une plaque** il faut :

50ul x 12 =600ul (+50ul) = **650ul** de solution de chaque IgG marquées

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

Homme: 1/1000 2ul IgG + 2ml Tampon pour **TROIS** plaques

Bœuf: 1/1000 2ul IgG + 2ml Tampon

Mouton: 1/500 4ul IgG +2ml Tampon

Porc: 1/1000 2ul IgG +2ml Tampon

07 -Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les sérums hétérologues au 1/1000ème.
Exemple: Tube anti-homme: aux AC marqués anti-homme dans 4ml tampon→ ajouter 4ul de sérum de bœuf + 4ul de sérum de mouton + 4ul de porc (tous les autres sérums sauf homme)

08 -Laver 2 fois au PBS-Tween

09 -Distribuer 50ul par puits de solution d'IgG marquées. Mettre une IgG par rangée

10 -Incubation 1h à RT sur la paillasse

11 -**VIDER LA PLAQUE. LAYER 4 FOIS AU PBS/TWEEN 20**

12 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer le **substrat de la peroxydase**

Pour 3 plaques :

*5mg d'**Ortho-tolidine** dans 0,25ml de **N,N-diméthyl formamide**

*30ml de **Tampon citrate**

*12ul de **H2O2** à 10% (ou 4ul à 30%).

13 -Distribuer 100ul de **substrat** par cupule

14 -**Incubation** à l'obscurité pendant 30minutes (coloration bleue 620nm)

- 15 - Blocage par 50ul d'**acide sulfurique 4N**: Coloration jaune.
- 19 -Lecture à 620 et 450nm sur le lecteur Elisa

8. 3. Protocole pour l'analyse des formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae* (LIN, 2003)

Formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

LIN 2003

Polymorphisme d'un segment de l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Réf: Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I & Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 2001, 10(1):19-23.

Amorces

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

Conditions PCR

Avec la **Taq Quiagen** (Cat. N 201207), pour un volume final de **25 µl** par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
MgCl 25 mM	1 mM	1.0 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer R3 (10 µM)	7.5 pmoles	0.75 µl
Primer R5 (10 µM)	7.5 pmoles	0.75 µl
Primer Mop int (10 µM)	15 pmoles	1.5 µl
Primer B/S int (10 µM)	15 pmoles	1.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		14.45 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

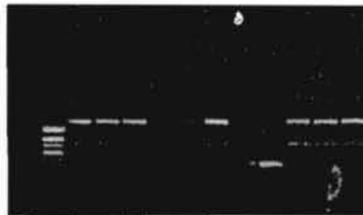
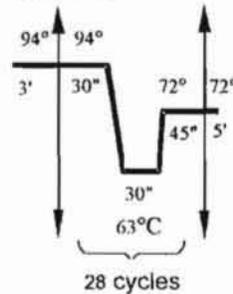
3' [30", 30", 45"]_{28c} 5' @ 63°C

Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



Mise en évidence de l'alimentation sucrée chez les moustiques vecteurs du paludisme à Soumouso et à Vallée du Kou, deux localités situées à l'Ouest du Burkina Faso.

Summary

Sugar feeding behavior of malaria vectors was monitored within two villages, Vallée du Kou (Bama) and Soumouso, Western Burkina Faso. From March to October 2007, a total of 1663 mosquitoes were captured outside and inside human dwellings by various collection techniques. *Anopheles gambiae* s.l. was the major vector species collected in the two localities. The presence of fructose in the mosquito midgut was detected by cold Anthrone test. On average 70 - 85.2% of males and 49.5 - 40.1% of females had fed on plant sugar. There was no significant seasonal variation in the proportion of mosquitoes that had fed a sugar meal. PCR analysis of molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. showed that 59% of M forms and 80% of S forms were positives for fructose in Vallée du Kou against 77.6% of M forms and 85.2% of S forms in Soumouso. Female mosquitoes took sugar meal at all physiological status (freshly fed, gravid or unfed). Both inseminate and non-inseminate females from the two study sites fed on plant sugar. In addition, 53.5% and 66.7% of nulliparous females took a recent sugar meal against 38.5% and 44.8% of parous females, respectively in Vallée du Kou and Soumouso. Collectively, these results indicate that sugar feeding is an important aspect of *Anopheles* ecology.

Key words: *Anopheles*, trophic behavior, Anthrone, Burkina Faso