

Evaluation de l'agressivité des anophèles et du risque de transmission du paludisme : méthodes utilisées dans les Armées françaises

Coffinet T¹, Rogier C², Pages F¹

1. Unité d'entomologie médicale, 2. Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaires, Equipe 7 « Maladies émergentes et moustiques », Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, URMITE-UMR6236, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Antenne IRBA de Marseille, Allée du Médecin colonel Jamot, Parc du Pharo, BP60109, 13262 Marseille cedex 07, France.

Med Trop 2009 ; **69** : 109-122

RÉSUMÉ • Lutter contre les vecteurs du paludisme nécessite de connaître les anophèles impliqués localement dans la transmission ainsi que leur biologie et leurs comportements. Deux méthodes de capture des moustiques adultes sont habituellement utilisées : la capture nocturne sur homme et les pièges lumineux avec appât humain. Cet article détaille ces deux méthodes (avantages et inconvénients) et une méthode de prospection des gîtes larvaires telles qu'elles sont mises en œuvre dans l'armée française.

MOTS-CLÉS • Paludisme. Vecteur. Anophèles. Méthodes d'échantillonnage. Transmission. Estimation. Armée. Taux d'inoculation entomologique. Gîtes larvaires.

EVALUATION OF THE ANOPHELINE MOSQUITO AGGRESSIVITY AND OF MALARIA TRANSMISSION RISK: METHODS USED IN FRENCH ARMY

ABSTRACT • Identification of the anopheline mosquito species involved in local transmission as well as knowledge of its biology and behavior is necessary for malaria vector control. To allow such study, two methods are usually used to capture adult mosquitoes, *i.e.*, night catches on human volunteers and light-trap collections with human bait. The purpose of this article is to describe these two methods including their advantages and disadvantages as well as a method of surveying breeding sites as implemented by French Army personnel.

KEY WORDS • Malaria. Vector. Anopheles. Sampling methods. Transmission. Estimation. Army. Entomological inoculation rate. Breeding site.

En zone intertropicale, le paludisme constitue une menace pour les Armées françaises par sa capacité à provoquer des épidémies. Les résistances croissantes de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques et des anophèles aux insecticides, l'absence d'immunité antipaludique des militaires français, contribuent à augmenter leur risque d'accès palustre simple ou grave à l'occasion de missions en zone d'endémie.

Pour lutter efficacement contre le paludisme, et particulièrement contre ses vecteurs, il est essentiel d'évaluer :

- le risque entomologique de transmission, dans le temps et dans l'espace, auquel les populations sont exposées.
- l'efficacité des mesures de lutte antivectorielle (LAV) mises en œuvre.

Sur le terrain, l'évaluation du risque de transmission et de l'efficacité de la lutte antivectorielle nécessite d'échantillonner les moustiques adultes et les larves. En pratique, différentes méthodes permettent :

- de capturer les moustiques adultes en vue de les identifier et de les dénombrer,
- de prospector les gîtes larvaires, de capturer les larves de moustiques, d'identifier leurs genres et espèces et de les dénombrer.

Cet article présente les méthodes d'échantillonnage entomologique utilisées dans les Armées françaises pour l'évaluation des niveaux de risque de transmission du paludisme et de l'efficacité de la lutte antivectorielle.

Echantillonnage des moustiques adultes

Objectifs et principes

Echantillonner les moustiques adultes, en particulier les anophèles, qui se posent sur la peau d'humains ou s'en approchent très près pour piquer permet d'évaluer directement le nombre de piqûres par personne et par unité de temps, appelé «agressivité». Cet indice sert ensuite à calculer le taux d'inoculation entomologique (TIE), *i.e.* le nombre de piqûres par anophèles infectés par des espèces plasmodiales par personne et par unité de temps. Une méthode indirecte et souvent biaisée est d'estimer l'agressivité par la capture des moustiques par des pièges avec ou sans appât humain. Ces méthodes sont présentées ci-dessous.

Deux méthodes sont utilisées en milieu militaire, selon le contexte local et opérationnel et selon la disponibilité des res-



Figure 1. Piège à lumière près d'un dormeur sous moustiquaire non imprégnée d'insecticide (© C. Rogier)

• Correspondance : thierrycoffinet@orange.fr

sources en équipement, en personnels et en moyens financiers (rémunérations, logistique) :

1. La capture nocturne sur appât humain à l'intérieur et à l'extérieur des habitations.

2. La capture par piège lumineux installé dans une chambre, près d'un dormeur qui sert d'appât sous une moustiquaire non imprégnée d'insecticide (Fig. 1).

Ces méthodes peuvent être mises en oeuvre dans l'enceinte des emprises militaires, sur des sites de déploiement ou en périphérie de ceux-ci, dans ou à proximité de villes ou de villages. Elles nécessitent généralement la coopération des populations autochtones.

La capture nocturne sur appât humain

- *Méthodologie*

- *Horaires de capture*

La capture des anophèles est organisée du crépuscule à l'aube, pendant leur période d'agressivité. Les heures peuvent varier selon les lieux et la saison mais s'étendent classiquement de 18 heures à 6 heures le lendemain matin. Il peut être nécessaire de prolonger jusqu'à 7 heures du matin, le nombre de piqûres d'anophèles n'étant parfois pas négligeable entre 6 heures et 7 heures. Ainsi, il ne faut pas hésiter à élargir les horaires de capture lorsque les effectifs d'anophèles capturés au cours de la première ou de la dernière heure de la séance sont considérés comme importants.

- *Choix des postes de capture*

Les captures doivent être organisées simultanément à l'intérieur et à l'extérieur des maisons pour estimer respectivement l'agressivité des vecteurs endophages et exophages. L'effort de capture (*i.e.* le nombre de postes) doit de préférence être le même à l'intérieur et à l'extérieur.

À l'intérieur, on choisit de préférence des locaux habituellement habités (imprégnation «d'odeurs humaines» perçues par les moustiques), calmes, sans déplacement excessif de personnes, ouverts sur l'extérieur par une porte ou une fenêtre (pour laisser entrer les moustiques) en évitant les pièces où des produits chimiques à activité répulsive ont été ou sont stockés (insecticides stockés, imprégnant des moustiquaires ou des murs; carburants,...) ou les pièces qui ont pu être enfumées (cuisines, fours, incinérateurs, buanderies). Idéalement, il faut choisir des chambres ou des salons, éventuellement un couloir ou une entrée.

À l'extérieur, on privilégie les postes à l'abri du vent où quelques personnes ont l'habitude de se retrouver, éloignés des feux, des lieux de rassemblement trop importants (compétition d'attraction des moustiques) ou de passage nocturne trop fréquent des habitants (qui entreraient en compétition pour les moustiques). On peut choisir des terrasses ou des auvents couverts mais ouverts sur au moins trois faces qui protègent les captureurs de la pluie et du vent.

Les postes de capture doivent être les plus éloignés possible les uns des autres afin de limiter les phénomènes de compétition et ne doivent jamais être distants de moins de 10 mètres et de préférence être distants de plus de 30 mètres.

En pratique, il faut négocier avec les habitants les choix des postes de capture. La présence d'un captureur dans une maison peut être perçue comme gênante et il peut être malaisé de la faire accepter dans un salon ou dans une chambre (à moins que le captureur fasse partie de la famille). Si nécessaire, on peut être amené à louer des chambres pour les nuits de capture.

- *Choix et rotation des captureurs*

Pour des raisons d'acceptabilité et parfois de sécurité, il est préférable de choisir les captureurs dans les communautés où sont

organisées les séances de capture. Il s'agit généralement d'hommes jeunes volontaires (l'emploi de femmes en âge de procréer est proscrit pour éviter l'exposition d'un embryon ou d'un fœtus au paludisme et à une chimioprophylaxie). Les captureurs ne doivent ni se parfumer, ni utiliser de répulsifs ou de cosmétiques, ni fumer (effet répulsif), ni capturer les moustiques ailleurs que sur leur peau, ni s'endormir, ni quitter le poste de capture (*e.g.* pour uriner) pendant la période où ils opèrent. Ils doivent être fiables et il ne faut pas hésiter à changer de captureur s'il a enfreint une de ces règles.

Sur le plan méthodologique, il existe plusieurs variantes d'organisation des séances de capture. Trois modalités sont présentées ci-dessous :

1. Généralement, deux captureurs (un binôme) opèrent successivement sur chaque poste de capture au cours d'une nuit. Chaque captureur est relevé au bout de deux heures (parfois une heure) par le deuxième captureur du binôme. Dans un site donné, les binômes de captureurs alternent sur chacun des postes de capture, à l'intérieur et à l'extérieur des habitations. De cette manière, les biais d'estimation de l'agressivité en fonction des horaires et des postes de capture qui peuvent être liés à l'attractivité et à l'habileté des captureurs sont minimisés.

2. Chaque captureur opère en continu pendant une durée de 6 à 7 heures (la moitié de la séance). L'unique rotation des captureurs, généralement à minuit, est plus facile à organiser mais expose à des biais d'estimation de l'agressivité horaire : l'agressivité en première et en deuxième moitié de nuit n'est pas estimée par les mêmes captureurs. Ici aussi, il est recommandé de faire tourner les binômes sur les différents postes de capture au cours des séances successives.

3. Afin de limiter le risque d'endormissement, deux captureurs opèrent parfois ensemble sur un même point de capture pendant toute la moitié de la nuit. On a alors besoin de quatre captureurs par poste. Par ailleurs, les captureurs ne doivent pas être installés trop près les uns des autres (jamais à moins de 10 mètres) afin de limiter l'effet de compétition qu'ils vont mutuellement exercer sur les anophèles.

Le rythme des nuits de captures varie selon l'objectif (évaluation initiale, suivi saisonnier, évaluation d'une intervention de LAV), la saisonnalité et le niveau présumé de l'agressivité et de la transmission. L'effort de capture doit être d'autant plus important et régulier que l'estimation de l'agressivité et de la transmission doit être précise, que la saisonnalité est marquée ou le pic d'agressivité et de transmission sont brefs, ou que leurs niveaux attendus sont bas.

À titre indicatif il peut être proposé d'effectuer une à deux nuits de capture par semaine en saison de forte transmission et seulement une à deux nuits de capture par mois lorsque le niveau d'agressivité ou de transmission est stable, par exemple pendant les mois où il est nul dans les sites où l'agressivité et la transmission sont connus pour être strictement saisonnières.

- *Équipement*

Il comprend le matériel et consommables nécessaires pour un poste de capture, pour l'ensemble de la séance de capture et pour l'aménagement de l'aire de repos, soit :

- * Pour chaque poste de capture :

Une chaise ou un tabouret

Un sac de poste de couleur claire sur lequel est inscrit le numéro de poste et le type de poste (intérieur ou extérieur) et qui comprend :

- 13 sacs horaires, plus petits, de couleur claire sur lesquels sont inscrits le numéro du poste, son type et la tranche horaire (par exemple : 18-19h, 19-20h, etc...). Les sacs horaires sont rangés les uns sur les autres dans l'ordre des heures ;

- une quantité suffisante de tubes de capture en verre ou plastique, bouchés par du coton (nombre à adapter en fonction de l'agressivité attendue des moustiques);

- une lampe torche avec des piles et des ampoules neuves;
- un réveil.

* Pour la séance de capture, l'ensemble du matériel suivant peut être contenu dans une malle :

- l'ensemble des sacs de poste complets;
- une réserve de lampes torche pour les captureurs et une lampe pour chaque superviseur;
- un stock de piles et d'ampoules de rechange pour les lampes torche.

* Pour l'aire de repos des captureurs :

- des nattes;
- un réchaud et de la vaisselle;
- du thé, du café et du sucre...

L'ensemble peut être complété d'une table et de chaises.

• Organisation des séances de capture

- Une à deux heures avant la séance de capture

1. Dispenser une formation pratique sur la méthodologie utilisée ou un simple rappel aux captureurs et aux superviseurs.

2. Fixer les postes de capture avec si possible un nombre égal de postes à l'intérieur et à l'extérieur des habitations ou locaux et procéder à un tirage au sort des postes retenus si les possibilités de poste sont assez nombreuses.

3. Si la méthodologie retenue est la rotation toutes les 2 heures de 2 captureurs pour un poste, alternant captures et repos, choisir une « aire de repos » au centre de la zone de capture mais éloignée de plus de 30 mètres des postes de capture. Elle devra être soit intérieure dans une habitation soit extérieure mais abritée des intempéries.

4. Vérifier que tout l'équipement est rassemblé pour la séance de capture.

5. Constituer les binômes de captureurs pour chaque poste et désigner le captureur n° 1 qui commencera la séance et le captureur n° 2 qui prendra sa relève au bout de deux heures (ou d'une heure). Inscrire les noms des captureurs sur une fiche récapitulative et descriptive des postes (localisation, type,... si nécessaire avec un plan schématique). Remplir aussi une fiche de présence pour les rémunérations. Remettre ces fiches au superviseur.

- A partir du début de la séance de capture

6. Mettre en place chaque captureur à son poste. Assis sur sa chaise, il est soit en short, soit son pantalon est relevé au dessus du genou. Les chaussures et les chaussettes doivent être enlevées. Le sac de poste avec les tubes de capture est disposé d'un côté, les sacs horaires sont empilés à part dans l'ordre chronologique horaire, le sac correspondant à l'heure actuelle est isolé et le réveil est installé face au captureur.

7. Tous les moustiques qui se posent sur les jambes, pieds et chevilles sont attrapés dans les tubes de capture (un moustique



Figure 2. Capture sur la peau. (© T. Coffinet)



Figure 3. Moustique Aedes capturé dans le tube. (© T. Coffinet)

par tube) à la lueur de la lampe torche (Fig. 2, 3). Un tube prêt, coton ôté, est toujours tenu dans une main. La lampe torche éteinte, tenue dans l'autre main, éclaire le moustique dès qu'il se pose si on le sent ou après l'avoir aperçu en balayant alternativement les deux faces des deux jambes à intervalles réguliers (toutes les deux à trois minutes). Idéalement, le moustique doit être capturé dès son posé, avant qu'il ne pique. Le moustique posé sur la peau est capturé en approchant le tube avec précaution (Fig. 4). Le moustique est coincé dans le tube avec le pouce puis le tube est rebouché avec le coton. Il est alors placé dans le sac horaire correspondant à la tranche horaire.

D'autres techniques existent avec aspirateur à bouche et gobelets horaires à la place des sacs pour récupérer les moustiques.

Il est interdit de capturer les moustiques posés ailleurs que sur les jambes et les pieds (en particulier sur les murs, etc.).

8. Changer de sac horaire à chaque changement d'heure.

9. Lors de la relève, ramener ses sacs (un ou deux sacs selon la durée entre deux relèves) à l'aire de repos et les ranger en tas par poste, dans l'ordre chronologique.

10. En cas de pluie sur un poste extérieur, se déplacer de quelques mètres où il est possible de poursuivre la capture à l'abri (toit auvent, terrasse extérieure, abri de bus...), selon les consignes



Figure 4. Position du tube pour la capture du moustique posé sur la peau. (© T. Coffinet)

préalablement établies, et revenir à l'emplacement initial une fois que la pluie a cessé.

- *En fin de séance de capture*

11. Les sacs sont rassemblés et récupérés pour l'identification. Si celle-ci doit être reportée, conserver les moustiques au frais dans un réfrigérateur ou une glacière.

- *Rôle et activités du superviseur*

Il remplit la fiche de présence signée par chaque captureur puis détermine les postes des binômes avec le numéro d'ordre des captureurs. Il doit gérer les relèves à chaque poste et faire en sorte que celles-ci se fassent sans retard. Il accompagne les captureurs et s'assure du bon fonctionnement des lampes torches. Il fait changer les piles et ampoules si nécessaire. Il contrôle la qualité du travail des captureurs en passant à l'improviste sur tous les postes où il s'assure du respect des consignes de travail. Le superviseur doit être indépendant des captureurs. Idéalement, il ne doit pas appartenir à la même famille ou à la même communauté.

- *Sécurité du travail de capture sur appât humain :*

Pour ne pas exposer les captureurs aux maladies transmises par les vecteurs, les captureurs doivent être :

1. informés des risques éventuels encourus

2. mis sous une chimioprophylaxie antipaludique efficace et prolongée, selon les molécules utilisées jusqu'à une semaine à un mois (selon le médicament utilisé) après la fin du travail,

3. vaccinés contre la fièvre jaune,

4. pris en charge médicalement si ils étaient atteints par une telle maladie (qu'elle ait été contractée pendant ou en dehors des séances de travail)

Les séances de capture ne doivent pas être organisées pendant les épidémies d'arboviroses (dengue, chikungunya...).

- *Consignes et aménagements particuliers*

* Il faut éviter que les captureurs ne s'endorment en séance de capture : surveillance étroite par le superviseur et fourniture de boissons stimulantes (thé ou café).

* Il est interdit aux captureurs de quitter leurs postes ou de changer celui-ci d'emplacement. On doit leur conseiller d'aller aux toilettes en dehors des temps de capture.

* Il est interdit de fumer pendant la capture ou à côté d'un captureur à l'affût.

* Il est interdit aux captureurs de s'appliquer des cosmétiques ou des produits répulsifs.

* Les relations avec les habitants doivent faire l'objet d'une attention particulière : donner des consignes précises de discrétion, d'amabilité et de règles de conduite (ne pas se déplacer dans la maison, ne pas demander de présents, à boire ou à manger, ne pas faire de bruit, ne pas déplacer les objets, ne pas salir l'environnement, respecter les coutumes - par exemple en se déchaussant en entrant dans une maison, demander l'autorisation avant d'entrer dans les maisons ou les chambres), aider et conseiller les habitants autant que nécessaire.

La capture par piège lumineux près d'un dormeur sous moustiquaire non imprégnée d'insecticide

• *Méthodologie*

Un piège lumineux est installé toute la nuit, du début de nuit à l'aube, près d'un dormeur servant d'appât à l'abri d'une moustiquaire non imprégnée d'insecticide (Fig. 1). Les moustiques attirés par le gaz carbonique et les odeurs de l'appât puis par la lumière du piège, sont précipités par un ventilateur dans un sac. Le sac est récupéré le matin. Les moustiques sont alors identifiés et comptés.

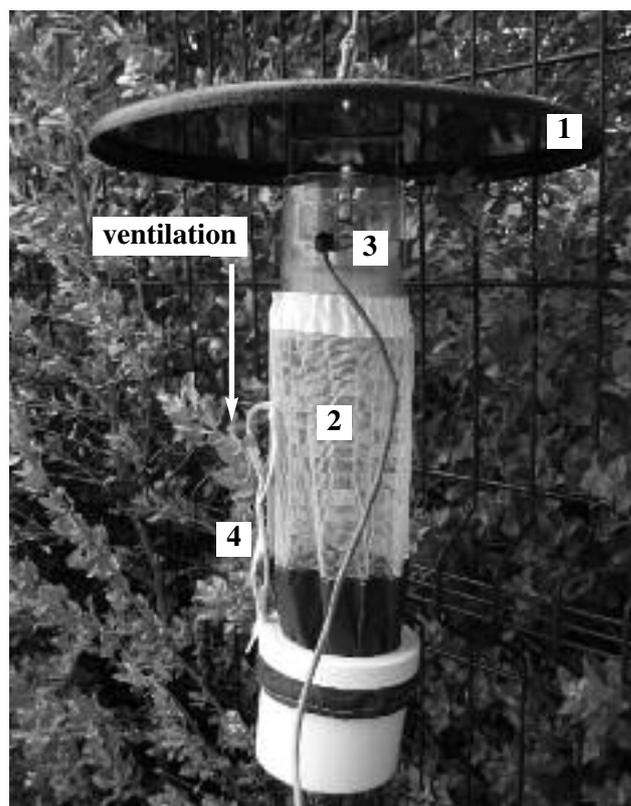


Figure 5. Eléments constitutifs du piège à lumière (© T. Coffinet)

Cette méthode de capture n'est utilisable qu'en intérieur (habituellement peu ou pas de collecte d'anophèles d'Afrique à l'extérieur).

Le choix et la disposition des postes de capture sont les mêmes que pour la capture sur appât humain.

• *Eléments constitutifs du piège lumineux*

Le piège est constitué d'une lampe électrique, d'un ventilateur et d'un sac de collecte (Fig. 5). Il comprend :

- un plateau noir (1) pour protéger le piège de la pluie en utilisation extérieure ;

- un sac/dispositif de collecte (2) : boîte en plastique et grillage métallique avec un manchon en tulle moustiquaire ;

- un corps transparent (3) qui contient le moteur, le ventilateur et le support de l'ampoule électrique ;

- des câbles de connexion du piège à la batterie ;

- une batterie 6 volts.

Un dispositif de fixation du piège doit permettre de le suspendre à une hauteur fixe (environ 1,5 mètres). Le piège doit être installé soit aux pieds, soit à la tête de l'appât humain. Dans le cadre d'une étude ou d'un système de surveillance, le piège doit toujours être disposé, à la tête ou aux pieds, de la même manière pour tous les postes et pour toutes les séances de capture.

L'ampoule, la batterie et son niveau de charge conditionnent la lumière émise pendant la nuit et donc le pouvoir attractif du piège. A ce titre, ils doivent être conformes aux normes.

La batterie doit être complètement rechargée pour chaque utilisation.

• *Procédure opérationnelle*

1. Préparer le dispositif de fixation du piège près de la moustiquaire du dormeur, à sa tête ou à ses pieds, selon les indications du protocole.

2. Monter le piège : plateau supérieur, corps du piège (ampoule & ventilateur), crochet ou cordelette de fixation en haut du piège. Il n'est pas obligatoire d'installer le plateau (1) au-dessus de l'ampoule lumineuse pour une utilisation à l'intérieur.

3. Ajuster le sac de collecte (2) autour de la base de la coque en plastique transparente du piège (3).

4. Humidifier un morceau de coton et le placer au contact extérieur ou au fond du dispositif de collecte. Il sert à éviter que les moustiques ne se dessèchent au cours de la nuit sous l'effet du ventilateur

5. Identifier le dispositif de collecte (boîte plastique) en l'étiquetant avec un numéro enregistré sur une fiche de séance de capture (emplacement, nom de l'appât, heure de mise en place, conditions météorologiques...).

6. Fixer le piège à une hauteur d'environ 1,5 mètres au-dessus du sol (prendre le haut du piège comme référence), aux pieds ou à la tête (procéder toujours de la même manière) de l'appât sous une moustiquaire non-imprégnée d'insecticide.

7. Au début de la séance (en pratique à 18 heures), connecter les câbles du ventilateur à la batterie en respectant les polarités. S'assurer que le souffle du ventilateur est bien dirigé vers le bas (vers le sac/dispositif de collecte).

8. En fin de séance (à 6 ou 7 heures le matin), inspecter le filet, le tapoter pour diriger les moustiques du haut vers le bas, nouer le lien (4) pour fermer le filet du sac/dispositif de collecte avant d'arrêter le ventilateur.

9. Déconnecter la batterie puis démonter le piège et retirer le sac/dispositif de collecte.

10. Mettre les batteries en recharge pour la séance suivante.

11. Au laboratoire, placer le sac/dispositif de collecte au congélateur à -20°C (ou dans un sac étanche avec un bout de coton imprégné de chloroforme en prenant soin qu'il ne soit pas en contact avec une matière plastique) pendant environ 10-20 minutes. Vider le sac/dispositif de collecte dans un plateau blanc pour trier les moustiques et les placer dans des coupelles (ou des boîtes de stockage) en vue de leur identification.

Les points suivants doivent être vérifiés :

* La polarité du branchement de la batterie et le sens de la pulsion d'air par le ventilateur (vers le sac/dispositif de capture)

* Le niveau de chargement de la batterie (charge complète au début de chaque séance)

* La présence d'un morceau de coton humidifié, dans ou sur le sac/dispositif de collecte

* La lubrification du moteur du ventilateur (en particulier s'il est bruyant)

* L'absence de trou dans le sac/dispositif de collecte (les occlure le cas échéant)

Choix et mise en œuvre de la méthode d'échantillonnage

• Choix de la méthode

Le choix de la méthode de capture est déterminé par les objectifs de l'échantillonnage, les moyens à disposition, les conditions opérationnelles militaires et les avantages et inconvénients de chaque méthode (Tableau I).

- Le piège lumineux placé près d'un appât humain échantillonne les insectes volants, dont les moustiques, attirés par la lumière (stimulus non spécifique), par le gaz carbonique et/ou par les odeurs émises par l'appât. La faune échantillonnée comprend donc des moustiques femelles hématophages à la recherche de leur repas de sang, dont des vecteurs, mais aussi de nombreux insectes

Tableau I. Les avantages et les inconvénients des méthodes de capture de moustiques adultes.

Méthodes	Avantages	Inconvénients / limites
Piège lumineux près d'un dormeur sous moustiquaire non imprégnée d'insecticide (Fig. 1)	- pas d'exposition de l'appât aux piqûres - facile à mettre en œuvre et peu contraignante - facilement reproductible - faible coût récurrent et nécessitant des ressources humaines limitées en nombre et en compétence	- coûteux à l'achat - spécificité faible, améliorée si près d'un dormeur, mais dans des proportions peu connues - capture de moustiques mâles - capture de moustiques ne piquant pas l'homme - nombreux biais possibles - attractivité différentes des individus (appâts) - efficacité variable - représentativité variable et généralement limitée - assèche ou tue une proportion importante des moustiques capturés
Capture nocturne sur appât humain (Fig. 2)	- capture directe des moustiques se posant sur la peau, c'est-à-dire qui piquent l'homme (anthrophiles) : mesure spécifique de l'agressivité (minimisation des biais) - capture exclusive de moustiques femelles - conservation des moustiques (permettant leur identification et leur étude) - Evaluation possible du rythme d'agressivité horaire	- risque professionnel d'exposition aux piqûres (nécessite une prise en charge des captureurs : chimioprophylaxie antipaludique et vaccination anti-malaria) - long, laborieux et coûteux - résultat dépendant fortement du personnel (attractivité, compétences professionnelles) - non utilisable en période d'épidémie d'arboviroses - problèmes d'acceptabilité des captureurs dans les foyers ou les enceintes militaires.

volants non piqueurs ou non attirés par les humains. Ce piège permet d'identifier et de dénombrer les vecteurs présents. Il permet d'évaluer grossièrement l'abondance des moustiques en estimant le nombre de vecteurs par piège et par nuit. Par rapport à l'agressivité, cette estimation est généralement biaisée : les proportions respectives de chaque espèce de moustiques capturés représentent rarement les proportions d'espèces de moustiques piquant les humains. L'importance de ces biais dépend des localités, des périodes et des espèces de moustiques mais est généralement imprévisible. Elle ne permet pas d'échantillonner les anophèles vecteurs exophages en Afrique subsaharienne. Le nombre de moustiques capturés dans un piège lumineux est généralement inférieur (parfois très inférieur) au nombre de moustiques capturés sur appât humain. Les différences interhumaines d'attractivité des appâts sont une autre source de variabilité du nombre de moustiques et d'anophèles capturés. Lorsque cette méthode est utilisée de façon standardisée (même piège, même disposition, même appât), elle peut permettre de suivre l'évolution des densités vectorielles. Elle ne peut pas évaluer le rythme d'agressivité par tranches horaires. Dans un site donné et à une période donnée, la capture par piège lumineux devrait idéalement être étalonnée par rapport à la capture sur appât humain si on veut l'utiliser pour estimer l'agressivité anophélienne et la transmission du paludisme.

- La capture nocturne sur appât humain permet d'estimer directement l'agressivité, sur la nuit ou par tranches horaires (rythme d'agressivité). Elle n'échantillonne que la faune d'intérêt, celle qui

est attirée par les humains pour effectuer des repas sanguins. Elle peut être utilisée sur les vecteurs endophages et exophages. Elle permet des estimations non biaisées des proportions relatives des vecteurs piquant les humains. Le nombre de piqûres par homme et par nuit estimé ainsi ne peut cependant pas représenter exactement le niveau d'agressivité auquel est exposée la population. Les captureurs restent immobiles, en intérieur ou en extérieur, sans attitude d'évitement ou de protection, et en exposant volontairement leurs jambes et leurs pieds. Ce n'est pas la situation habituelle des populations qui dorment habituellement dans des lits, souvent couvertes par des tissus (vêtements, draps) et qui essaient de se protéger ou de se défendre contre les piqûres. On peut estimer, que l'agressivité estimée sur captureur surévalue d'environ 1,5 fois l'agressivité moyenne réelle. La surface corporelle, le pouvoir attractif individuel (qui dépend d'odeurs perçues par les moustiques, par exemple de substances produites par la flore bactérienne cutanée ou émises dans l'haleine exhalée) et d'autres facteurs individuels ou dépendant de la maison conditionnent le nombre de piqûres reçues et expliquent la variabilité inter-individuelle d'exposition qui peut être très importante (de l'ordre d'un facteur 10). Il est possible de limiter l'impact des variations interindividuelles d'attractivité et de capture en augmentant le nombre de captureurs et de postes de captures utilisés et en calculant des moyennes. Plus ces nombres sont élevés, plus les estimations sont précises et moins elles dépendent des particularités des individus impliqués. L'agressivité estimée sur captureurs doit donc être considérée comme une estimation moyenne au niveau de la communauté. Elle n'a pas de sens individuel.

• *Mise en œuvre des méthodes d'échantillonnage :*

En fonction des sites d'étude, de la méthode de capture considérée et des moyens disponibles, la mise en œuvre de l'échantillonnage nécessite de réaliser les activités suivantes dans l'ordre chronologique :

- contacter les personnalités et autorités locales pour leur présenter l'échantillonnage, ses objectifs et ses enjeux individuels et collectifs puis ses modalités pratiques ;
- déterminer le nombre de postes de capture : idéalement une dizaine ou plus ;
- définir les lieux et les types de postes de capture, soit intérieurs et extérieurs pour la capture sur homme, uniquement en intérieur pour les pièges lumineux. Une liste descriptive et un plan sommaire des postes de capture doivent être établis. Si le nombre possible de poste dépasse celui des postes utilisés, ces derniers doivent être tirés au sort pour améliorer leur représentativité. Les mêmes postes de capture devront être utilisés pendant toute l'étude ;
- rencontrer (sous couvert des autorités) les résidents des habitations retenues pour l'échantillonnage, les rassurer et leur expliquer l'organisation des séances de captures et les consignes strictes données aux captureurs et aux superviseurs locaux ;
- pour la capture sur homme, sélectionner et recruter des captureurs locaux, soit déjà expérimentés soit à former, ainsi que un ou plusieurs superviseurs parmi les personnes dynamiques et indépendantes ayant une autorité (*i.e.* plus âgées que les captureurs, d'une famille ou une communauté différente). Les superviseurs doivent être formés et étroitement accompagnés par les responsables de l'étude, au moins au cours des premières séances de capture ;
- vérifier le statut vaccinal anti amarile des captureurs, les vacciner si nécessaire ;
- fournir une chimioprophylaxie adaptée à la région et aux résistances prévalentes (utiliser idéalement la même chimioprophylaxie que les militaires français).

Collecte des données

Pour chaque type de méthode, des supports, formulaires et fiches différents sont élaborés pour consigner toutes les caractéristiques des séances de capture, leur déroulement et leurs résultats après identification des moustiques.

Une liste non exhaustive des données à collecter est la suivante :

• *Données sur les postes et la séance de capture*

- lieu et date de la séance de capture ;
- heures de début et de fin de la séance ;
- conditions météorologiques : température, orage, vent et pluie (préciser caractéristiques, durée, horaire). La clarté lunaire (différentes phases) doit être appréciée et notée (conditionne l'agressivité des moustiques) ;
- identification du poste de capture : numéro, lieu (quartier, logement ou bâtiment), type (intérieur ou extérieur), emploi habituel de la pièce, ouverture de la pièce sur l'extérieur, position sur un plan, coordonnées GPS ;
- identification du captureur : nom et prénom, numéro d'ordre (1 ou 2) de capture, numéro du poste de capture ou du piège lumineux ;
- nombre de personnes dormant/séjournant dans la même maison, dans la même pièce ;
- présence/absence de matériaux imprégnés d'insecticide dans la maison, dans la pièce, utilisation d'insecticide pendant la séance de capture ou au cours des jours précédents ;
- présence/absence de bétail à proximité pendant la séance : espèce, nombre, distance entre le lieu de stabulation et le poste de capture, localisation sur le plan ;
- remarques diverses sur la séance : incidents, etc..

• *Résultats des captures*

- nombres de moustiques capturés par poste, par genre et par espèce, et par heure pour la capture sur appât humain, notés sur une fiche de poste ;
- si les moustiques doivent être traités secondairement, pour l'identification moléculaire ou la recherche immuno-enzymatique d'une infection plasmodiale, ils sont conservés individuellement et doivent être enregistrés, avec un numéro d'identification unique, la date, le lieu et le poste de capture. Ces résultats sont consignés sur un cahier de capture des vecteurs.

Identification morphologique des genres de culicidés adultes et des espèces d'anophèles

Objectifs

L'identification des moustiques échantillonnés a pour objectif de connaître les genres et les espèces des vecteurs présents et de calculer par genre ou par espèce les indicateurs entomologiques de risque de transmission.

Méthodes et principes

L'identification morphologique est réalisée sous loupe binoculaire à l'aide de clés d'identification, de préférence sur des moustiques fraîchement capturés (idéalement dans les 24 heures suivant leur capture). Les étapes d'identification sont les suivantes :

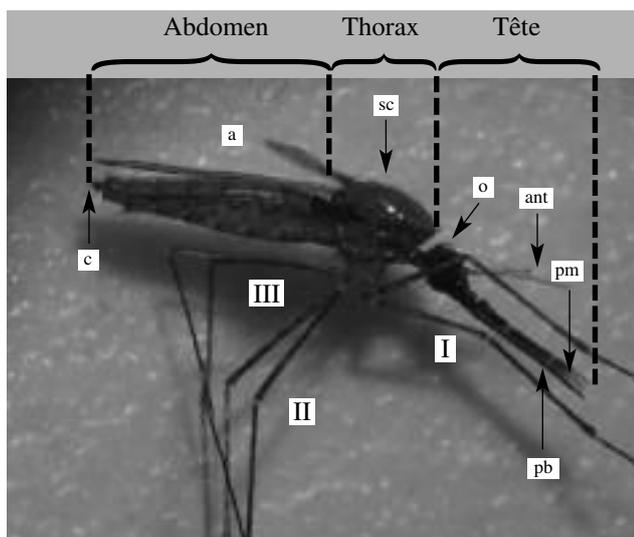


Figure 6. Morphologie générale d'un moustique. *Anopheles gambiae* s.l. (© Unité entomologie IMTSSA)

Légende des figures 6 et 7 : a: ailes; ant: antennes; c: cerques; o: œil; pb: proboscis ou trompe; pm: palpes maxillaires; sc: scutum; I,II,III: pattes antérieures, moyennes et postérieures

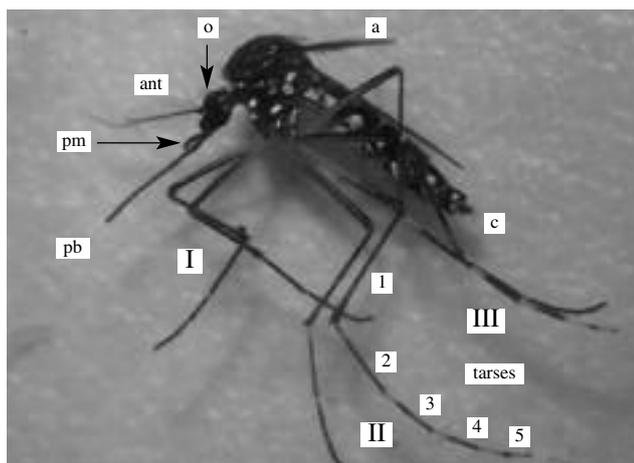


Figure 7. Morphologie générale d'un moustique. *Aedes aegypti*. (© Unité entomologie IMTSSA)

- détermination du sexe des moustiques pour ne retenir que les femelles;
- détermination du genre de moustiques femelles à l'aide d'une clé des genres. Les moustiques femelles de la sous famille Anophelinae sont ainsi séparés des femelles de la sous famille Culicinae (genres *Aedes*, *Culex*...);
- détermination de l'espèce d'anophèle à l'aide d'une clé des espèces universelle ou adaptée à la zone d'étude : continent, région ou pays. Pour les anophèles d'Afrique sub saharienne, la clé de M.T. Gillies et B. De Meillon de 1968 (4) et sa version illustrée de M.T. Gillies et Maureen Coetzee de 1987 (5), constituent 2 références très complètes.

Des espèces différentes de moustiques, y compris des anophèles, peuvent être morphologiquement indistinguables. Ces espèces sont dites appartenir à un complexe d'espèces. Par exemple, le complexe d'espèces d'*Anopheles gambiae* sensu lato comprend sept espèces distinctes dont *Anopheles gambiae* sensu stricto, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles melas*. Ces espèces ne peuvent être distinguées que par des méthodes génétiques,

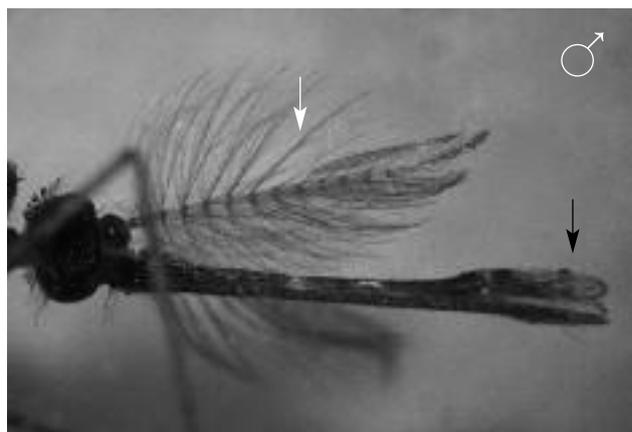


Figure 8. Tête d'un anophèle mâle (© Unité entomologie IMTSSA)

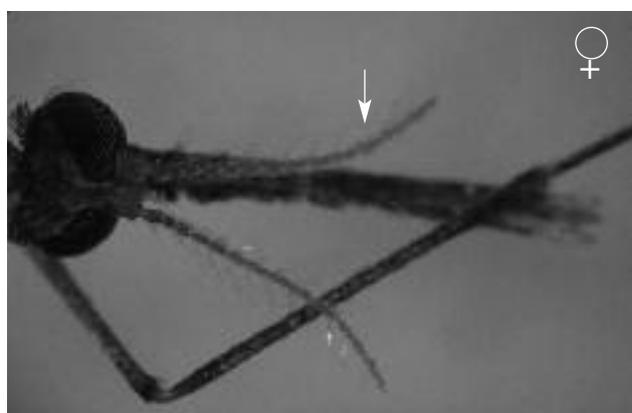


Figure 9. Tête d'un anophèle femelle. (© Unité entomologie IMTSSA)

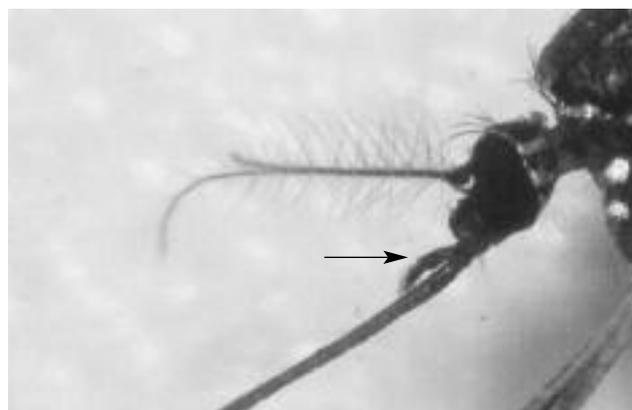


Figure 10. Tête de Culicinae femelle. (© Unité entomologie IMTSSA)

en particulier par PCR. (Polymerase Chain Reaction). Ces techniques de laboratoire ne sont pas présentées ici.

Morphologie générale des moustiques adultes et clés d'identification

Les clés d'identification des genres et des espèces à l'intérieur des genres sont construites sur la base de caractères morphologiques de différentes parties du moustique (Fig. 6, 7). Les caractères les plus fréquemment examinés, en particulier pour les clés de détermination des espèces sont :

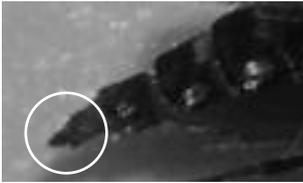


Figure 11. Extrémité abdominale pointue d'*Aedes* et d'*Eretmapodites* (© Unité entomologie IMTSSA)

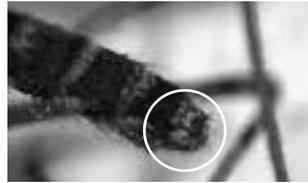


Figure 12. Extrémité abdominale à aspect obtus ou tronqué de *Culex* et *Mansonia* (© Unité entomologie IMTSSA)

- les palpes maxillaires (organes sensitifs de chaque côté de la trompe) et le nombre et l'aspect de bandes pâles (blanches) sur ces palpes ;

- l'aspect des pattes (souvent les tarses 1 à 5 des pattes postérieures, i.e. 3^e paire de pattes) et leurs taches ;
- l'aspect du bord costal et des nervures des ailes, en particulier les taches et/ou les écailles ;
- l'abdomen avec des écailles ou des bandes pâles dorsales ou ventrales.

L'observation de ces caractères et la reconnaissance de leurs différents aspects décrits dans les clés permettent par dichotomisation successive de séparer les moustiques par genre ou espèce. En pratique, la clé indique successivement, par écrit ou par des dessins expliqués (clés illustrées), l'aspect des caractères à examiner. Pour chaque caractère, il y a généralement deux possibilités (clés

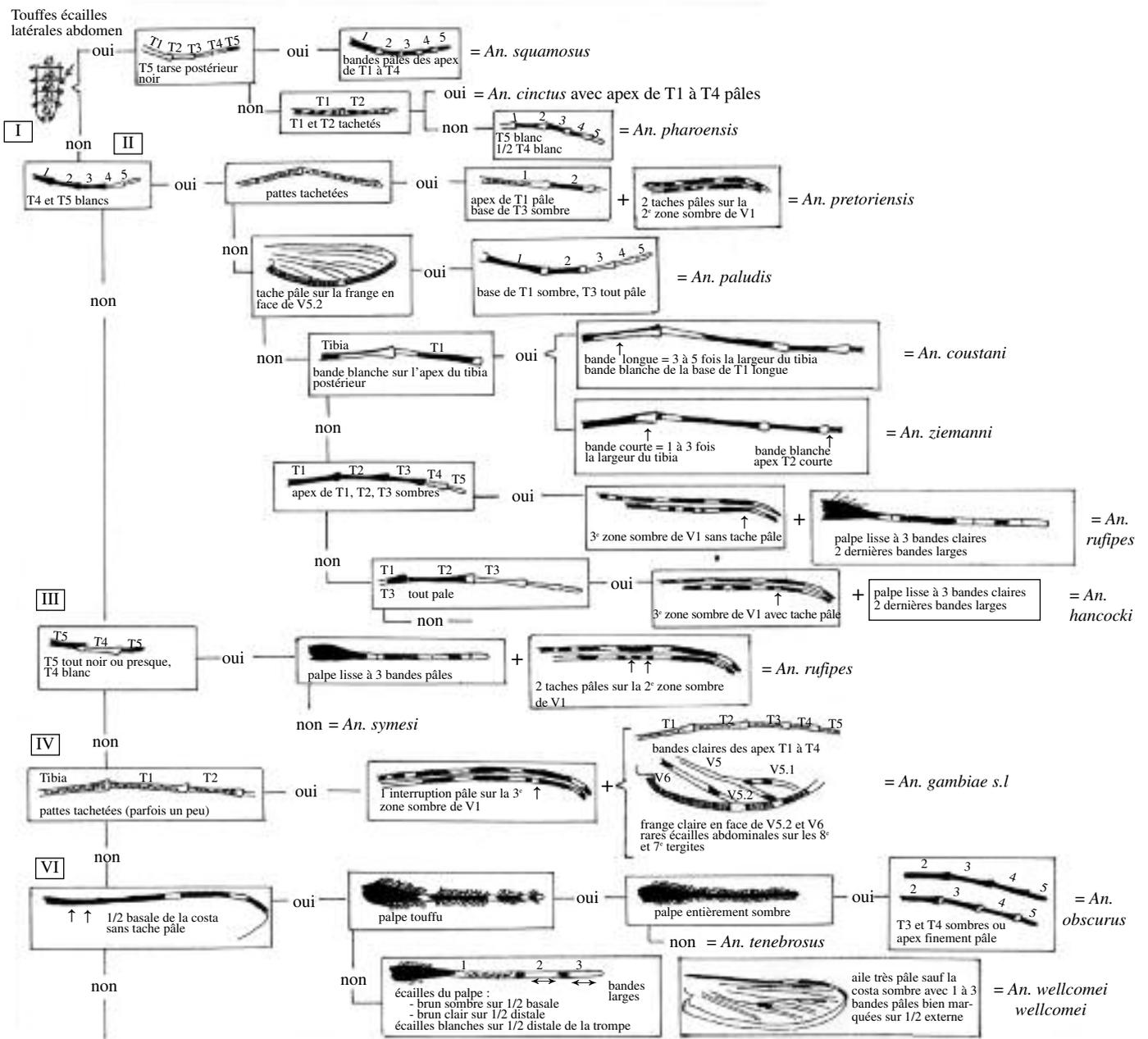


Figure 13 a. Clé simplifiée et illustrée construite pour une mission du Projet Impact Vector au Gabon (IMTSSA, 2006) (© T. Coffinet)

dichotomiques), chacune oriente vers de nouveaux caractères à examiner ou, finalement, au genre ou à l'espèce identifiée.

Les moustiques appartiennent à la classe des insectes et sont constitués de 3 parties (Fig. 6, 7) :

- la tête qui porte les paires d'yeux, d'antennes et de palpes maxillaires, et les pièces buccales (trompe ou proboscis) ;
- le thorax qui porte 3 paires de pattes et une paire d'ailes ;
- l'abdomen ;

• Détermination du sexe et du genre *Anopheles*

La détermination du sexe se fait au moyen des antennes (flèche blanche) et des palpes maxillaires (flèche noire) comme indiquée sur les figures 8-10.

Chez les mâles, les antennes sont plumeuses. Elles sont glabres (pas ou peu plumeuses) chez les femelles.

Parmi la famille des *Culicidae* (i.e. moustiques), le genre *Anopheles* appartient à la sous famille des *Anophelinae*, les autres genres de moustiques (*Aedes*, *Culex*...) appartenant à la sous famille des *Culicinae*. Les anophèles sont distingués des *Culicinae* par la longueur des palpes maxillaires (pm). Ils sont aussi longs ou presque aussi longs que la trompe (pb) chez les anophèles femelles; ils sont plus courts chez les autres moustiques.

L'aspect des derniers segments abdominaux permet de distinguer simplement deux groupes de genres de *Culicinae*. L'extrémité de l'abdomen est pointue chez les genres *Aedes* et *Eretmapodites* (Fig. 11), tandis qu'elle est obtuse (i.e. aspect tronqué) chez les genres *Culex* et *Mansonia* (Fig. 12).

• Exemple de clé d'identification des espèces d'anophèles

Un exemple de clé d'identification des anophèles adaptée à une région est présenté sur la figure 13 (a et b). Il s'agit d'une clé simplifiée et illustrée construite pour une mission de recherche (Projet «Impact Vector») dans les forces armées françaises au Gabon.

Prospection des gîtes larvaires et échantillonnage des larves de moustiques

Objectifs et principes

La production d'anophèles autour des populations humaines repose sur

- l'existence de gîtes larvaires naturels ou artificiels potentiellement favorables aux anophèles,
- la productivité de ces gîtes en anophèles.

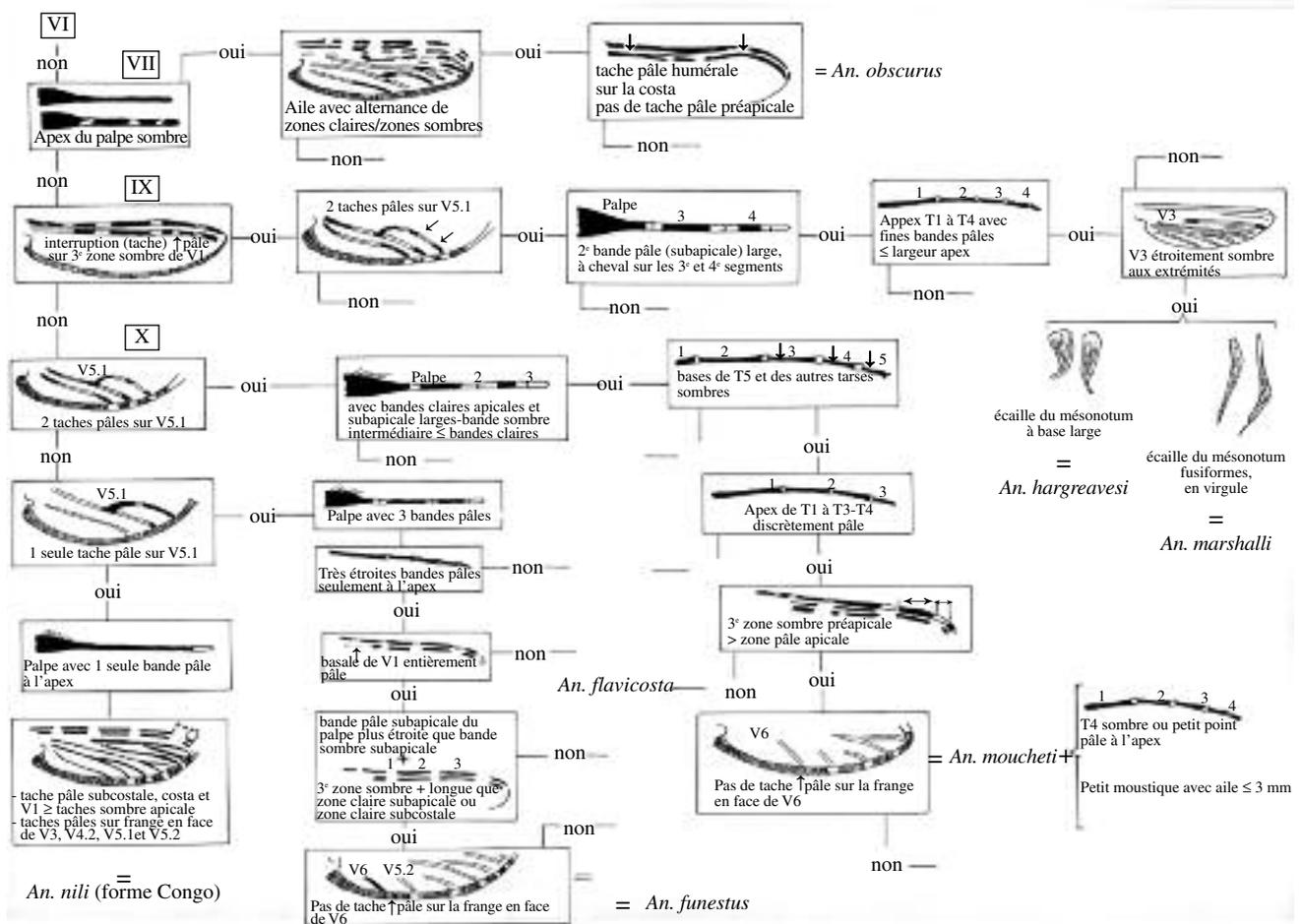


Figure 13b. Clé simplifiée et illustrée construite pour une mission du Projet Impact Vector au Gabon (IMTSSA, 2006). (© T. Coffinet)

La prospection larvaire consiste, sur le terrain, à identifier les gîtes larvaires en les caractérisant sur le plan physique et écologique, à les dénombrer, à les localiser et à estimer la densité de larves d'anophèles qu'ils contiennent par une méthode d'échantillonnage standardisée.

La zone géographique à prospector autour d'une communauté humaine est déterminée par la distance de vol actif des anophèles femelles. La distance parcourue activement par un anophèle femelle à la recherche d'un repas de sang est variable. Elle dépend des espèces, de leur préférence trophique (*i.e.* préférence pour piquer les humains ou des animaux), de la présence et de la densité d'hôtes vertébrés à piquer. Cette distance parcourue est d'autant plus faible que les hôtes vertébrés acceptables pour le repas sanguin du moustique sont nombreux et proches des gîtes larvaires. Dans une ville densément peuplée, elle est généralement de quelques dizaines à quelques centaines de mètres (souvent < 300 mètres). En milieu rural africain, lorsque les populations humaines ou animales sont dispersées, cette distance est plus importante. Elle excède rarement 4 km, et est en moyenne de 2 à 3 km. Cependant, *Anopheles gam-*

biae s.s. est capable de parcourir 9 à 10 kilomètres après s'être nourri de jus sucré ou s'être gorgé de sang sur un hôte (3).

L'étendue de l'aire de prospection larvaire dépend donc de l'écosystème et des densités de population. En ville, elle peut par exemple être réduite à un rayon de 100 à 200 mètres autour des zones d'intérêt.

Méthodes

• Caractéristiques des collections d'eau servant de gîte larvaire d'anophèles

Les gîtes larvaires d'anophèles ont des caractéristiques qui permettent, plus ou moins, de focaliser leur recherche. De manière générale, malgré des différences selon les espèces, les anophèles pondent dans des gîtes dont l'eau est :

- calme (ses larves sans siphon respiratoire se noieraient dans une eau agitée);
- douce le plus souvent, rarement saumâtre pour des espèces comme *Anopheles melas* ou *Anopheles merus* qui appartiennent au complexe *Anopheles gambiae s.l.*;



Figure 14. Marigot à Port-Gentil, Gabon, également gîte de *Culex* et de *Mansonia*. (© T. Coffinet)



Figure 16. Rétenue d'eau par défaut de drainage après les pluies, Port-Gentil, Gabon. (© T. Coffinet)

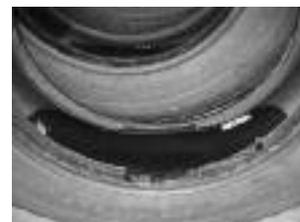


Figure 19. Collection d'eau dans des pneus, bon gîte à *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, Gabon. (© T. Coffinet)



Figure 15. Céane (puits) d'un jardin en milieu urbain, Dakar, Sénégal, gîte larvaire d'*Anopheles arabiensis* (© C. Rogier)



Figure 17. Zone de maraîchage, Libreville, Gabon. (© T. Coffinet)



Figure 20. Retenue d'eau dans un pot de fleur, bon gîte pour les *Aedes* Jardin privé à Libreville, Gabon. (© T. Coffinet)



Figure 18. Rizières de la vallée du Kou, Burkina Faso, gîtes larvaires à *Anopheles gambiae s.s.* et à *Anopheles funestus* (surtout lorsque le riz est plus haut) (© C. Rogier)



Figure 21. petite retenue d'eau dans un trou dans la terre après la pluie, potentiel gîte à *Anopheles gambiae*, Libreville, Gabon. (© T. Coffinet)

Planche 1. Gîtes larvaires : gîtes naturels, zones de maraîchage et retenues d'eau plus ou moins temporaires, naturelles et artificielles .

- éventuellement limoneuse ou boueuse mais généralement pas ou peu polluée et faiblement chargée en matières organiques. *Anopheles arabiensis* a cependant été trouvé dans des collections d'eau en partie polluées de villes d'Afrique de l'Ouest ;

- ensoleillée ;

- avec peu ou sans végétation (*Anopheles gambiae*) ou avec végétation dressée comme celle des rizières ou de certains marécages (*Anopheles funestus*) ;

Les anophèles peuvent s'adapter à différents milieux. Les indications données ci-dessus ne sont donc qu'indicatives. Lorsque l'on prospecte pour la première fois un site, il est préférable d'examiner toutes les collections d'eau.

Les gîtes peuvent être de grande taille ou de petite taille, temporaires ou permanents, d'origine naturelle ou artificiels et d'origine anthropique. Regroupant ces caractéristiques, ils sont donc extrêmement variés et une liste exhaustive ne peut être établie. A titre d'exemples, il peut s'agir de :

- bords calmes de rivière, près de la végétation où l'eau s'écoule plus lentement ;

- flaques de décrue en bordure de rivière ;

- bordures d'étendues d'eau tels que lacs, étangs, bassins près de la végétation des bords, ou à distance du bord près de végétations flottantes ;

- rizières, zones de maraîchage (en particulier dans les puits peu profonds ou les citernes d'irrigation) ;

- marigots, mares permanentes ou temporaires ;

- toute zone inondable par des pluies, des débordements de cours d'eau ou des fuites de système d'adduction d'eau ;

- flaques d'eau, ornières, caniveaux, fossés, empreintes de pas, même trou dans le bitume après la pluie ;

- fosse d'emprunt utilisée pour la confection de briques en banco et emplie d'eau par les pluies ;

- feuilles engainantes de certaines plantes ou arbres (broméliacées en Amérique du sud) ;

- culot de bouteille, soucoupe, chapeau... ;

- réserves d'eau à usage domestique (citernes sur les toits, fûts de 200 litres, calebasses) non couvertes ou protégées par des moustiquaires.

L'émergence d'adultes est possible si ces gîtes persistent (*i.e.* restent en eau) au moins 8 à 10 jours, durée minimale suffisante pour assurer le cycle aquatique dont la durée varie selon la température (plus il fait chaud, plus il est court) et de nombreux facteurs physiques et écologiques. A noter que de fortes pluies peuvent « lessiver » des petits gîtes et rompre leur production.

Les figures 14-21 de la planche 1 présentent des gîtes larvaires d'anophèles.

• *Données collectées au sujet des gîtes larvaires potentiels ou productifs*

Toutes les collections d'eau semblant pouvoir convenir pour la ponte des anophèles doivent être considérées comme des gîtes larvaires potentiels d'anophèles et sont identifiées comme gîtes larvaires si des larves y ont été capturées. Dans le reste du texte, nous les appelons simplement gîtes larvaires. La prospection doit permettre de relever les données suivantes au sujet des gîtes :

- localisation : sur un plan et, si possible, géo-référencement par GPS ;

- mode de constitution : naturel ou artificiel ;

- pérennité : gîte permanent ou temporaire ;

- dimensions : taille, profondeur ;

- végétation : environnante (*i.e.* sur la bordure) et en surface ;



Figure 22. matériels de collecte de larves : louche, plateau plastique blanc, pipettes et flacons pour l'échantillonnage des larves. (© T. Coffinet)

- faune aquatique potentiellement prédatrice de larves : poissons larvivores... ;

- caractéristiques physiques de l'eau : température (noter l'heure de la mesure), pH, salinité, turbidité, conductivité... ;

- ensoleillement : estimé par exemple par le pourcentage de la surface qui est exposée au soleil à midi ;

- traitements insecticides : existence d'une pulvérisation à visée anti-larvaire dans l'eau ou anti-adultes dans la végétation alentour, date de la pulvérisation, produit utilisé, quantité utilisée, organisateur de la pulvérisation ;

- présence de moustiques dont les larves d'anophèles par observation directe, sans échantillonnage.

Il peut être utile de compléter cette caractérisation par la prise de photographies enregistrées sous format électronique dans une base de données avec leurs références (localisation, date et heure). Cela permet, rétrospectivement, de compléter la caractérisation du gîte et de documenter son évolution temporelle.

• *Echantillonnage des gîtes larvaires par la méthode du « dipping »*

Il s'agit de récolter les larves d'un gîte à l'aide d'une louche selon une procédure standardisée pour estimer la densité larvaire (nombre de larves collectées par plongée de la louche dans le gîte).

Au moins sept techniques de dipping ont été décrites (5). Le choix de ces techniques dépend du genre de moustique dont on cherche les larves, du biotope et du temps. Les différences portent sur la façon de pratiquer le prélèvement à la louche, par rapport à la profondeur de l'eau et à la présence de végétation. Le nombre de louchées par gîte doit être adapté au volume et à la productivité du gîte.

Pour les larves d'anophèles, nous présentons ici la méthode la plus adaptée, préconisée par l'OMS. Elle peut éventuellement être remplacée ou complétée par d'autres techniques en fonction de l'environnement et de l'efficacité de la collecte.

- *L'équipement*

L'équipement de base comprend (Fig. 22) :

- une louche (environ 300 mL) (Fig. 22) ou un contenant de préférence de couleur blanche afin de mieux visualiser les larves avec un manche assez long permettant facilement de s'approcher et de puiser à la surface de l'eau. Des louches spécifiques existent dans le commerce mais il est possible d'en fabriquer par exemple avec un pot de yaourt de 500 g de couleur blanche ou à partir d'autres contenants ;

- un plateau plastique blanc de taille suffisante pour renverser le contenu de la louche (Fig. 22) de manière à repérer les larves, à les individualiser et à les compter ;

- des pipettes en plastique souple avec réservoir, type pastourettes, pour prélever les larves. Leur extrémité peut être coupée pour que le diamètre du conduit d'aspiration soit suffisant ;



Figure 23. Cahier de capture des vecteurs, tubes de capture et microtubes. (© T. Coffinet)

- des tubes ou pots en plastique pour transférer les larves prélevées. Pour conserver les larves vivantes jusqu'à leur émergence, le flacon est à moitié rempli de l'eau du gîte. Pour préserver les larves en vue de leur identification morphologique ou par technique de biologie moléculaire, les flacons doivent être remplis d'alcool à 70°. Dans ce dernier cas, il faut prendre soin de ne pas transvaser trop d'eau du gîte dans l'alcool ;

- des stylos feutres indélébiles pour référencer les flacons ;
- Réalisation du « dipping », procédure et précautions

La technique du « *Shallow skim* » décrite ci-dessous est efficace pour collecter les larves d'*Anopheles* qui ont tendance à rester plus longtemps en surface que les larves d'*Aedes* et de *Culex* qui sont souvent aux abords de la végétation et de débris flottants.

1. Approcher du gîte lentement et avec précautions, en limitant les vibrations au sol, en évitant de remuer la végétation en contact avec l'eau et de projeter son ombre à la surface de l'eau. Les larves et les nymphes sont craintives, leur nage est rapide et elles se réfugient promptement au fond du gîte ou sous la végétation.

2. Inspecter visuellement le gîte à la recherche de larves de moustiques et d'anophèles en particulier.

3. Repérer les endroits à échantillonner sur des surfaces d'eau calme (rebords ou anses calmes pour les cours d'eau), ensoleillées, près et au milieu de la végétation ou près de débris de surface. Les larves se trouvent rarement ou jamais dans les endroits où l'eau est libre et profonde.

4. En cas de vent fort, échantillonner au niveau du bord à l'abri du vent, celui dont la surface est la moins agitée et où se concentrent habituellement les larves et les nymphes.

5. Éviter l'échantillonnage en cas de pluie. La collecte des larves est alors plus difficile.

6. Approcher la louche de la surface de l'eau et la plonger doucement en faisant un angle de 45°.

7. S'assurer que les larves n'ont pas été dérangées et n'ont pas fui vers le fond, sinon attendre un ou deux minutes avant de recommencer et de poursuivre la récolte.

8. Déplacer horizontalement la louche ainsi positionnée, le long du gîte. Effleurer rapidement mais prudemment la surface, en ligne droite avec ou sans débris de surface.

9. Finir le mouvement juste avant que la louche ne soit remplie pour éviter le débordement et la fuite des larves et des nymphes et sortir la louche de l'eau en faisant attention de ne pas la renverser.

10. Verser l'eau dans le plateau blanc, puis aspirer les larves d'anophèles pour les transférer dans les tubes, flacons ou pots. Bien

séparer les larves d'anophèles de celles des autres genres. Les larves d'anophèles sont dépourvues de siphon et restent horizontales sous la surface de l'eau. Les larves de *Culicinae* ont un siphon visible et sont obliques ou plus ou moins verticales par rapport à la surface de l'eau. Les nymphes d'anophèles et de *Culicinae* ne peuvent être distinguées morphologiquement à l'œil nu.

11. Noter les références du gîte sur les contenants des larves et sur une fiche *ad hoc*.

12. Noter la date, l'heure, le nombre de prélèvements (« coup de louches ») par gîte.

13. Calculer la densité larvaire = nombre de larves les plus grosses, c'est à dire de stade 3 et 4 (dernier stade larvaire) par louchée ou pour n louchées par gîte.

Remarques :

- pour les très petits gîtes (trous de rochers, d'arbres ou dans la végétation), la même technique peut être utilisée avec d'autres ustensiles que la louche (e.g. cuillère...) ou avec des systèmes d'aspiration tubulaires ;

- la technique la plus communément utilisée est le « simple scoop » où coup de louche simple et unique. Il s'agit d'écoper une pleine louche d'eau. Elle est souvent utilisée en début d'investigation pour prospector rapidement toutes les collections d'eau. Elle est souvent citée dans la littérature comme « procédure standard de dipping ». Plus efficace pour la collecte des larves de *Culex* que d'anophèles, elle n'est pas la technique à privilégier ;

- la même technique doit être appliquée et reproduite pour chaque gîte.

Conditionnement des moustiques adultes et des larves pour la conservation et le transport

Conditionnement des moustiques adultes

Il peut être nécessaire de conditionner les moustiques adultes capturés, vecteurs potentiels, en vue de leur transport, de leur conservation et de leur analyse ultérieure par des tests de biologie moléculaire (diagnostic moléculaire d'espèce au sein d'un complexe d'espèce; marqueurs moléculaires de résistance aux insecticides, e.g. Kdr, Ace1) ou la recherche immuno-enzymatique de l'infection des anophèles par des sporozoïtes (technique ELISA).

Les moustiques encore vivants dans leur tube de capture peuvent être tués au congélateur ou à l'aide de chloroforme. Par

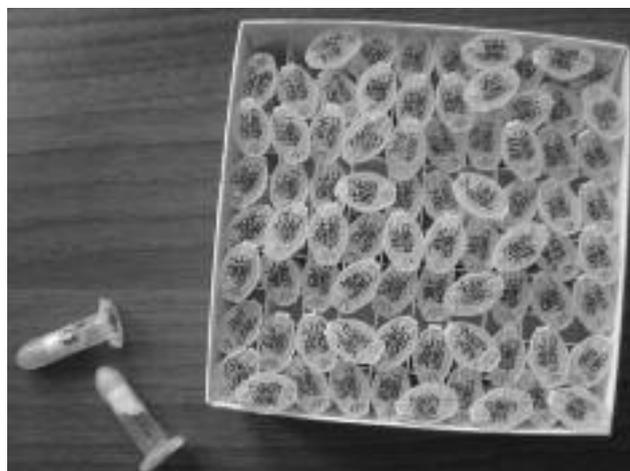


Figure 24. Boîte de rangement des microtubes. (© T. Coffinet)

exemple, on regroupe des tubes de capture dans une poche plastique (e.g. sac poubelle) et on dépose un coton imbibé de chloroforme au milieu des tubes. Attention, le chloroforme peut dissoudre les plastiques.

Chaque moustique identifié individuellement par un numéro unique (cf. cahier de capture des vecteurs, Fig. 23) est alors déposé entier dans un microtube (type tube eppendorf 1,5 mL) contenant, au fond, une couche de granulés dessiccateurs (i.e. silicagel), une mince couche de coton et un petit carré de papier (Fig. 23). Le numéro individuel du moustique est alors inscrit au feutre fin indélébile sur le microtube, sur le haut du bouchon et sur le côté.

Les microtubes sont ensuite rangés dans des boîtes (Fig. 24) et conservés au congélateur à -20°C. Ils peuvent aussi être expédiés ainsi par colis express en glacière avec accumulateurs de froid.

Conditionnement des larves

Pour leur identification, les larves peuvent être conservées en flacon dans l'eau du gîte avec ou sans substrat nutritif, en s'assurant d'une oxygénation suffisante, jusqu'à leur émergence.

Les nymphes non identifiables peuvent aussi être mises en émergence séparément.

Les larves et les nymphes peuvent être conservées dans l'alcool à 70° pour leur identification ultérieure macroscopique ou par biologie moléculaire (PCR).

Echantillonnage de la faune culicidienne par pièges à CO₂ et à odeurs

Objectifs et principes

Pour évaluer les risques potentiels de transmission de maladies par les moustiques, il est nécessaire d'échantillonner la faune culicidienne dans une région ou un lieu donnés et à une période ou saison données. La répétition de cet échantillonnage peut être laborieuse ou impossible par les techniques précédentes, faute de personnel compétent sur place.

Il est alors possible d'utiliser d'autres pièges que les pièges lumineux. Ils attirent les moustiques en diffusant du gaz carbonique et/ou des odeurs ou des composés d'odeurs humaines (sueur, acide lactique, octénol).

Dans tous les cas, les moustiques attirés sont aspirés et précipités dans un sac/dispositif de collecte.

Méthodes

Parmi les différentes méthodes d'échantillonnage, deux méthodes simples peuvent être proposées :

- le piège «Mosquito magnet» qui attire les insectes diptères hématophages, dont les moustiques, en émettant du gaz carbonique associé éventuellement à des substances odorantes attractives à faible distance. Les insectes utiles (papillons, abeilles) ne sont pas attirés ;

- le piège «BG sentinel», léger, simple, utilise le BG lure, attractant spécifique, qui imite l'odeur émise par la peau humaine en diffusant un ensemble de plusieurs composés pour une durée d'environ 5 mois (en région tempérée). Dans ce cas, le genre *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*...) et quelques espèces du genre *Culex* (*Culex quinquefasciatus*...) sont attirés. Il est possible d'y ajouter l'émission de gaz carbonique qui



Figure 25. piège Mosquito Magnet (vue d'ensemble) © T. Coffinet

permet d'échantillonner un plus grand nombre de genres de moustiques.

• Piège Mosquito Magnet®

- Objectif

Ce piège a été initialement conçu pour réduire la nuisance culicidienne en diminuant ses populations. Il est alors utilisé en batteries réparties sur les aires à démosstiquer. Il peut néanmoins être utilisé pour un échantillonnage de la faune culicidienne.

- Procédure opérationnelle d'utilisation du piège Mosquito Magnet®

Ce piège ne peut s'utiliser qu'à l'extérieur. Il en existe plusieurs modèles (consulter le site www.mosquitomagnet.com).

Ajusté sur un pied, le piège est monté sur un socle à roulettes facilitant le transport. Le corps de l'appareil comprend (Fig. 25) :

- un système qui permet la production et la diffusion de gaz carbonique ;
- un système de ventilation-aspiration et de récupération des moustiques dans un compartiment muni d'un filet récepteur ;
- une batterie rechargeable (sur certains modèles, un système de recharge de la batterie par panneau solaire est disposé sur le dessus de l'appareil) ;
- un logement pour la substance attractive.

Le gaz carbonique est produit par craquage catalytique du propane ou du butane. Des bouteilles de propane ou de butane sont donc nécessaires. Elles sont généralement disponibles dans le commerce de détail. Elles sont installées dans un emplacement sur le socle. Une substance attractive, l'octénol, peut être ajoutée dans son compartiment.

La procédure d'installation est la suivante :

1. Se conformer aux instructions de montage et de sécurité du manuel du piège selon le modèle. Il faut d'abord monter le socle, puis le pied sur le socle et enfin le corps du piège sur le pied.
2. Installer la batterie qui aura été chargée préalablement pendant 24 heures.
3. Installer le filet récepteur dans son compartiment.
4. Déposer si besoin le produit attractif dans son logement (le changer tous les 21 jours).
5. Préparer et placer le piège. Le placer si possible à l'abri du vent, à plus de 1,5 mètres de buissons, massifs, lisières..., à l'ombre et sur un sol plat. Eviter de le placer contre un bâtiment ou

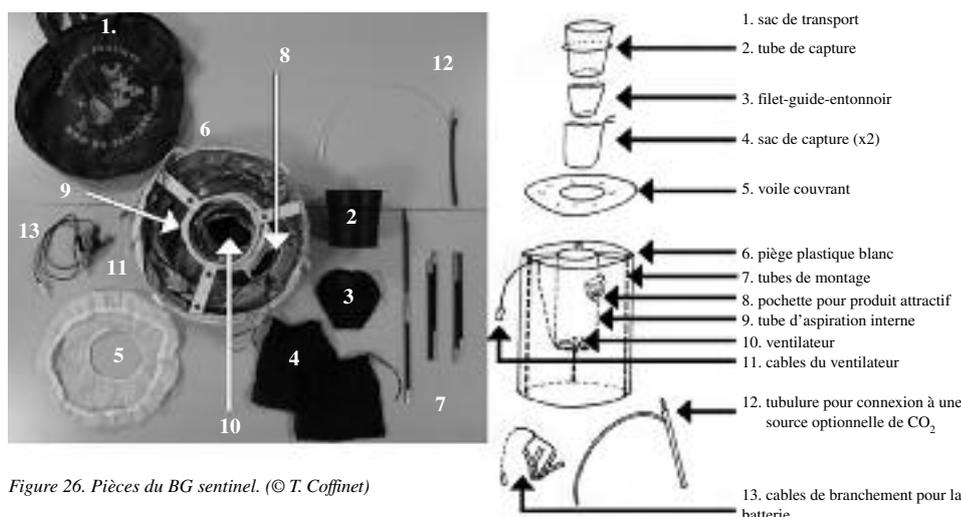


Figure 26. Pièces du BG sentinel. (© T. Coffinet)

une clôture, ou exposé à de possibles aspersion d'eau par le dessous. Le piège peut par contre fonctionner sous la pluie.

6. Mettre en marche.

Remarques :

- Pour un fonctionnement en permanence (e.g. pendant plusieurs mois) l'alimentation par le panneau solaire permet d'entretenir la charge initiale de la batterie.

- Ne pas oublier de fermer l'arrivée de gaz au niveau de la bouteille avant chaque déplacement du piège (gaz inflammable).

- Après arrêt du piège, les moustiques peuvent être récupérés. S'ils séjournent longtemps dans le filet, ils se dessèchent. Dans un objectif d'échantillonnage et d'identification, les moustiques doivent donc être récupérés rapidement, toutes les journées ou demi-journées par exemple.

• Piège BG sentinel®

- Objectif

Le piège BG Sentinel® a été conçu spécifiquement pour piéger les moustiques vecteurs de fièvre jaune et de dengue, c'est à dire essentiellement *Aedes aegypti*. Il fonctionne aussi très bien sur *Aedes albopictus*, et sur d'autres moustiques appartenant au genre *Culex* et, dans une moindre mesure et si une source de gaz carbonique est ajoutée, sur le genre *Anopheles*, vecteur de paludisme. Il permet donc surtout d'évaluer et de surveiller le risque de transmission d'arboviroses par les *Aedes* (6).

- Procédure opérationnelle d'utilisation du BG sentinel®

Ce piège peut s'utiliser à l'extérieur ou à l'intérieur des locaux et habitations. Il est constitué d'un ensemble cylindrique souple



Figure 27. a) BG sentinel installé avec source de CO₂ par carboglace en glacière. b) Manœuvre de retrait du filet extérieur contenant les moustiques. (© T. Coffinet)

dépliable contenu dans un sac de transport plat. Cet ensemble comprend (Fig. 26) :

- une armature centrale au fond de laquelle est installé un ventilateur avec son moteur et contre laquelle se situe une poche pour déposer le produit attractif (BG Lure) ;

- un élément tubulaire rigide séparé sur lequel viennent s'ajuster deux filets, un filet intérieur troué à sa base et un filet extérieur qui le recouvre et qui récupère les moustiques aspirés ;

- trois montants articulés qui permettent de consolider l'ensemble.

Procédure d'installation (Fig. 26) :

1. Assembler le piège avec les montants : 7.

2. Sortir les câbles : 11 du ventilateur.

3. Déposer le produit attractif ouvert dans sa pochette : 8.

4. Recouvrir l'ouverture avec le voile blanc : 5.

5. Adapter et ajuster le tube de capture noir : 2 avec l'ensemble des deux filets : 3 et 4 autour de sa base.

6. En cas d'utilisation d'une source de CO₂ ajoutée ou employée seule, à partir d'une bouteille de gaz carbonique ou de carboglace dans une glacière (Fig. 27a), ajuster la tubulure fournie sur l'extrémité d'un montant et la connecter à celle en provenance de la source de gaz carbonique.

7. Brancher les câbles aux pôles correspondants de la batterie 12 volts.

Pour récupérer les moustiques (Fig. 27b), il faut retirer l'ensemble cône plastique/filets et récupérer le filet extérieur (contenant les moustiques) en le fermant à l'aide du cordon et en le faisant glisser précautionneusement le long du filet intérieur.

Remarques :

- Il faut éviter d'exposer le piège au vent, à la pluie et au soleil direct. Les endroits favorables sont ceux près des gîtes de repos des moustiques adultes non loin de la végétation ou près des gîtes larvaires de tous types.

- Le gaz carbonique peut être utilisé seulement à l'extérieur.

Références

1. Anonyme. Malaria entomology and vector control. Tutor's Guide WHO/CDS/CPE/SMT/2002.18. Rev.1 part II. http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CPE_SMT_2002.18_Rev.1_PartieII.pdf
2. Kaufmann C, Briegel H. Flight performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J vector Ecol* 2004 ; 29 : 140-53.
3. Gillies MT, Botha de Meillon. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region) 2d ed. *Publications of the South Afr Inst Med Res* 1968 ; 54 : 343 p.
4. Gillies MT, Coetzee M. A supplement to the anophelinae Africa South of the Sahara (Afrotropical region). Johannesburg. South Africa Institute of Medical Research, 1987, 143 p.
5. O'Malley C. Seven ways to a succesful dipping carrer. *Wing beats* 1995 ; 6 : 23-4.
6. Williams CR, Long SA, Webb CE, Bitzhenner M, Geier M, Russell Rc et al. *Aedes aegypti* population sampling using BG-Sentinel traps in north Queensland Australia: statistical considerations for trap deployment and sampling strategy. *J Med Entomol* 2007 ; 44 : 345-50.