



REPUBLIQUE DU BENIN

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

Numéro d'enregistrement : 32/EDSV

Année Académique : 2011-2012

Présentée par : **Gil Germain PADONOU**
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

OPTION : ENTOMOLOGIE MEDICALE ET VETERINAIRE

Contrôle de *Anopheles gambiae* (Diptera, Nematocera, Culicidae), vecteur du paludisme, par le bendiocarb en pulvérisation intradomiciliaire à grande échelle dans le département de l'Ouémedé au Bénin

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Présidente : Isabelle ADOLE GLITHO, Professeur Titulaire, Université de Lomé, Togo

Directeur de Thèse : Martin AKOGBETO, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Rapporteurs : Ousmane FAYE, Professeur Titulaire, Université Cheikh Anta Diop, Sénégal

Fabrice CHANDRE, Chargé de Recherche, IRD, France

Sahidou SALIFOU, Professeur agrégé, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Examinateurs : Karim DRAMANE, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Dorothée KINDE GAZARD, Professeur agrégée, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Date de soutenance : 06 Juillet 2012. Mention : Très honorable avec les félicitations du jury

Sommaire

Titres	Pages
Sommaire.....	1
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des annexes	12
Dédicace.....	13
Remerciements.....	14
Chapitre 1 : Introduction et généralités.....	20
1-Introduction générale.....	21
2-Généralités.....	27
2-1- Epidémiologie du paludisme.....	27
2-1-1- Répartition du paludisme dans le monde.....	27
2-1-2- Les parasites.....	29
2-1-3-Les anophèles vecteurs.....	30
2-1-3-1-Taxonomie.....	30
2-1-3-2-Répartition dans le monde.....	31
2-1-3-3- Distribution du complexe <i>An. gambiae</i> au Bénin.....	32
2-1-3-4- Biologie de <i>An.gambiae s. l.</i>	33
2-2- La lutte antivectorielle.....	34
2-2- 1-La lutte antilarvaire.....	35
2-2- 2-La lutte contre les adultes	35
2-2- 2-1- La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent	35
2-2- 2-2-L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action..	37
2-2- 2-3- Autres méthodes de lutte contre les adultes.....	38
2-2-3-Les procédures de gestion des insecticides en santé publique.....	39
2-2-3-1- Homologation des produits.....	40
2-2-3-2- L'acquisition des pesticides.....	40
2-2-3-3- La qualité du produit et le réemballage.....	40
2-2-3-4-Le stockage et le transport.....	41
2-2-3-5-L'épandage.....	41
2-2-3-6-L'élimination.....	42
2-2-3-7- Le suivi et la surveillance.....	43

2-2-3-8- Renforcement des capacités et la mobilisation de la communauté.....	43
2-3- Les résistances du parasite aux médicaments et du vecteur aux insecticides	43
2-3-1- La résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> aux médicaments.....	44
2-3-2- La résistance de <i>Anopheles gambiae</i> aux insecticides.....	44
2-3-2-1- La résistance métabolique.....	45
2-3-2-2- La modification de cible.....	45
2-3-3-Gestion de la résistance.....	47
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	48
1-Evaluation en cases expérimentales de l'efficacité de quelques insecticides pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamate en pulvérisation intradomiciliaire.....	49
1-1-Présentation de la station d'étude.....	49
1-2- Evaluation de l'attractivité des cases pour les moustiques : captures au temps zéro (To).....	52
1-3-Traitement des cases.....	52
1-4- Captures après traitement des cases à l'insecticide.....	53
1-5- Les lâchers-recapture.....	54
1-6- Paramètres étudiés.....	54
1-7- Informations sur les effets secondaires des insecticides utilisés.....	55
2-Evaluations à l'échelle communautaire.....	56
2-1-Présentation de la zone d'étude.....	56
2-2-Volet sociologique.....	59
2-2-1- Collecte des données.....	59
2-2- 2-Echantillonnage.....	59
2-3-Volet entomologique.....	60
2-3-1-Echantillonnage des moustiques.....	61
2-3-2-Identification et traitement des anophèles vecteurs.....	64
2-3-3-Test de sensibilité aux insecticides.....	65
2-3-4- Le traitement des murs.....	67
2-3-5- Réalisation des tests d'efficacité du bendiocarb appliqué sur les murs.....	67
2-3-6-Vérification du concept de "long lasting" (longue durée d'action) attribué aux moustiquaires Permanet 2.0	69
2-3-7-Approbation éthique.....	70
2-3-8-Les paramètres mesurés.....	71
2-4-Volet Clinique.....	72

3- Mise en place des interventions.....	73
3-1-La pulvérisation intradomiciliaire.....	73
3-2-La distribution des moustiquaires.....	76
4-Analyse statistique.....	77
Chapitre 3 : Evaluation en cases expérimentales de l'efficacité de quelques insecticides pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamate en pulvérisation intradomiciliaire....	79
1-Introduction.....	80
2-Résultats.....	80
2-1- Attractivité des cases-pièges pour les moustiques.....	80
2-2- Résultats des captures après traitement des cases à l'insecticide.....	81
2-2-1-Réduction du taux d'entrée et d'exophilie induite.....	81
2-2-2-Impact sur le taux de gorgement	82
2-2-3-Impact sur la mortalité.....	82
2-2-3-1-Impact sur le taux de mortalité immédiate.....	82
2-2-4-2-Impact sur le taux de mortalité totale.....	83
2-3-Effets des traitements des cases sur les dormeurs.....	87
3-Discussion et conclusion.	87
3-1-Discussion.....	87
3-2-Conclusion.....	89
Chapitre 4 : Données de base entomologique et sociologique en prélude à la campagne de pulvérisation intradomiciliaire et à l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées (Permanet 2.0) dans les communes de Sèmè-Kpodji, Dangbo, Missérétré et Adjohoun.....	90
1-Introduction.....	91
2-Etude de l'environnement physique et sociologique du paludisme en prélude à la mise en œuvre d'une campagne de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dans le département de l'Ouémé au Bénin.....	92
2-1-Résultats.....	92
2-1-1-Connaissances, attitudes et pratiques des populations sur le paludisme et ses vecteurs.....	92
2-1-1-1-Les connaissances des populations sur le paludisme et son vecteur.....	92
2-1-1-2-Les moustiquaires et autres mesures utilisées pour lutter contre les moustiques.....	93
2-1-1-3-Perceptions et acceptabilité des populations pour la PID.....	95
2-1-1-4-Relation entre la perception de la PID, le niveau d'instruction, les pratiques médicales et le sexe.....	96

2-1-2- Les types d'habitats rencontrés et leurs états.....	97
2-2-Discussion et conclusion.....	100
2-2-1-Discussion.....	100
2-2-2-Conclusion	103
3-Evaluation entomologique du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans le département de l'Ouémé au Bénin.....	103
3-1-Résultats.....	104
3-1-1-Espèces de moustiques rencontrées.....	104
3-1-2-Densité vectorielle et dynamique des populations.....	106
3-1-2-1-Densités moyennes au repos dans les habitations humaines et par piège fenêtre...106	
3-1-2-2- Comportement endophile et taux de gorgement.....	107
3-1-2-3- Densité agressive moyenne et fluctuations saisonnières du taux d'endophagie selon les localités.....	109
3-1-3-Age physiologique et infectivité de <i>An. gambiae</i>	112
3-1-4-Résultats des tests de sensibilité et de caractérisation moléculaire chez <i>An. gambiae</i> .114	
3-2-Discussion et conclusion.....	117
3-2-1-Discussion.....	117
3-2-2-Conclusion.....	121
Chapitre 5 : Impacts de la pulvérisation intradomiciliaire.....	122
1-Introduction.....	123
2-Effets du bendiocarb en PID et de la couverture en PermaNet 2.0 sur le comportement des populations de <i>Anopheles gambiae</i> résistant aux pyréthrinoïdes dans le département de l'Ouémé au sud du Bénin.....	124
2-1-Résultats.....	124
2-1-1- Variation du taux d'entrée de <i>An. gambiae</i>	124
2-1-2- Variation du taux d'endophilie de <i>An. gambiae</i>	125
2-1-3- Variation du taux de gorgement de <i>An. gambiae</i>	126
2-1-4- Variation du taux de gravidité de <i>An. gambiae</i>	127
2-1-5- Variation du taux de mortalité de <i>An. gambiae</i>	128
2-1-6- Variation du taux d'endophagie de <i>An. gambiae</i>	129
2-2-Discussion et conclusion.....	130
2-2-1-Discussion.....	130
2-2-2-Conclusion.....	132

3-Impact de la PID à base de bendiocarb et de la couverture en PermaNet 2.0 sur la transmission du paludisme dans une zone de forte résistance de <i>An. gambiae</i> aux pyréthrinoïdes	132
3-1-Résultats.....	133
3-1-1-Diminution drastique du nombre de piqûres de moustiques (Culicidae) dans les zones d'interventions.....	133
3-1-2-Diminution des piqûres de moustiques <i>An. gambiae</i> dans les zones d'interventions...134	
3-1-3-Baisse drastique des taux d'inoculation entomologique dans les zones d'interventions	138
3-1-4-Variation des taux de parturité dans les zones d'interventions.....	138
3-1-5-Variation de l'incidence palustre dans les zones d'interventions.....	139
3-2-Discussion et conclusion.....	141
3-2-1-Discussion.....	141
3-2-2-Conclusion.....	143
4-Etude de la rémanence des insecticides sur les supports imprégnés.....	144
4-1-Résultats.....	144
4-1-1- Effet résiduel du bendiocarb sur les différents supports.....	144
4-1-2-Variation de l'effet résiduel du bendiocarb en fonction de la position du cône sur les supports traités.....	147
4-1-3-Vérification du concept de long lasting attribué aux moustiquaires de type Permanet 2.0	149
4-2- Discussion et conclusion.....	150
4-2-1- Discussion.....	150
4-2-2-Conclusion.....	152
5-Dynamique de la résistance de <i>Anopheles gambiae</i> dans les communes soumises à la pulvérisation intradomiciliaire de bendiocarb et aux moustiquaires de type Permanet de 2008 à 2010.....	152
5-1-Résultats.....	153
5-1-1- Espèces et formes moléculaires de <i>An. gambiae</i>	153
5-1-2- Fréquences des mutations <i>kdr</i> et <i>ace-1^R</i> de <i>An. gambiae</i> capturé sur homme.....	154
5-1-3- La sensibilité de <i>An. gambiae</i> aux insecticides.....	156
5-1-4- Fréquences des mutations <i>kdr</i> et <i>ace-1^R</i> des survivants et des morts de <i>An.gambiae</i> 24 h après exposition aux insecticides.....	157
5-2-Discussion et conclusion.....	160

5-2-1-Discussion.....	160
5-2-2-Conclusion.....	163
Chapitre 6 : Discussion générale, conclusion et perspectives.....	164
1-Discussion générale.....	165
2-Conclusion générale et perspectives.....	170
Références bibliographiques.....	172
Curriculum vitae.....	191
Annexes.....	195

Liste des figures

Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde	28
Figure 2 : Cycle de développement du <i>P. falciparum</i>	30
Figure 3 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels.....	32
Figure 4 : Cycle de développement de <i>An. gambiae</i>	34
Figure 5: Rôle de l'acétylcholinestérase1 (<i>ace-1</i>) dans la transmission synaptique.....	46
Figure 6 : Carte de localisation de Akron.....	50
Figure 7 : Cases expérimentales construites à Akron.....	51
Figure 8 : Détails et description d'une case- piège	51
Figure 9 : Carte de la zone d'étude montrant les communes sélectionnées	58
Figure 10 : Capture des moustiques sur homme.....	61
Figure 11: Collecte des moustiques dans un piége-fenêtre.....	62
Figure 12: Gîtes et collecte des larves dans une flaue d'eau pluviale.....	63
Figure 13: Dispositif montrant l'emplacement des larves élevées à l'insectarium du CREC.	63
Figure 14: Diagramme montrant le processus d'identification et de traitement des anophèles vecteurs.....	65
Figure 15: Réalisation du test en cylindre OMS.....	66
Figure 16: Introduction des <i>An. gambiae</i> dans le cône fixé au mur.....	68
Figure 17: Contact des <i>An. gambiae</i> avec le support traité	68
Figure 18: Conservation des <i>An. gambiae</i> en observation durant 24h après exposition au bendiocarb sur les différents supports traités.....	68
Figure 19 : Réalisation des tests en cône sur les moustiquaires.....	70
Figure 20 : Emballage de la formulation de bendiocarb utilisée.....	74
Figure 21 : Agents d'hygiène en cours de formation	74
Figure 22 : Pulvérisateurs manuels à pression préalable du type HUDSON XPERT.....	75
Figure 23: Applicateurs en tenue prêts pour la pulvérisation.....	75
Figure 24: Moustiquaire posée dans un ménage.....	76
Figure 25 : Densités moyennes de <i>An. gambiae</i> et de Culicinés dans les cases pièges du 5 au 15 septembre 2007 avant le traitement des cases à l'insecticide.....	81
Figure 26 : Habitats en banco à Dangbo.....	98
Figure 27 : Habitats en bambou et en ciment construites côté à côté, dans l'arrondissement de Aholouyèmè à Sèmè.....	98

Figure 28 : Effectif des types d'habitats en fonction de la nature des supports dans les 4 communes	99
Figure 29 : Proportion des chambres présentant des ouvertures pouvant faciliter l'entrée et la sortie des moustiques dans l'ensemble des 4 communes	99
Figure 30 : Habitat présentant beaucoup d'espace entre le mur rugueux et le toit avec de nombreuses fentes dans les murs (Dangbo)	100
Figure 31 : Habitat avec un plafond sans trou, le mur lisse sans fente et sans espace (Dangbo).....	100
Figure 32: Variations saisonnières de la densité agressive des femelles <i>de An.gambiae</i> capturées à l'intérieur et à l'extérieur par localité.....	111
Figure 33: Corrélation entre la mutation <i>kdr</i> et les survivants à la perméthrine.....	116
Figure 34: Variation des taux d'endophagie et d'exophagie de <i>An. gambiae</i> avant et après les interventions de PID dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè....	130
Figure 35 : Evolution du taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> souche sensible Kisumu en fonction de la position (haut, milieu, bas) du cône sur les supports.....	148
Figure 36 : Evolution du taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> sauvage en fonction de la position (haut, milieu, bas) du cône sur les supports.....	148
Figure 37 : Variation des taux de mortalité par insecticide de 2007 à 2010 dans chaque localité.....	157

Liste des tableaux

Tableau I : Insecticides recommandés par l'OMS pour la pulvérisation à effet rémanent à l'intérieur des habitations contre les vecteurs du paludisme.....	36
Tableau II : Insecticides recommandés par l'OMS pour le traitement des moustiquaires.....	38
Tableau III : Nombre de moustiquaires collectées en fonction de la durée d'utilisation.....	70
Tableau IV : Données entomologiques relatives à l'impact des traitements sur <i>An.gambiae</i> enregistrées au cours des deux premiers mois après le traitement des cases (entrée libre des anophèles).....	84
Tableau V : Données entomologiques relatives à l'impact des traitements sur les culicinés enregistrées au cours du 1 ^{er} mois après le traitement des cases (entrée libre des Culicinés)..	85
Tableau VI : Données entomologiques relatives à l'impact des traitements sur <i>An. gambiae</i> enregistrées au cours des quatre premiers mois après le traitement des cases (lâcher de <i>Anopheles gambiae</i> : souche locale Akron).....	86
Tableau VII : Récapitulation des impressions recueillies des captureurs sur les effets des cases après le quatrième mois de traitement.....	87
Tableau VIII : Niveau d'instruction, perceptions des individus et des pratiques liées au paludisme et ses vecteurs, selon les localités.....	93
Tableau IX : Moyens de protection contre les moustiques.....	94
Tableau X : Expériences et perceptions des communautés sur les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticide.....	96
Tableau XI. Associations entre la connaissance de la PID, le sexe, le niveau d'instruction et les pratiques médicales.....	97
Tableau XII. Associations entre l'acceptation de la PID, le sexe, le niveau d'instruction et les pratiques médicales.....	97
Tableau XIII: Diversité des espèces de moustiques rencontrées à Adjohoun, Dangbo, Misséréto et Sèmè, durant la saison sèche (janvier à mars) et la saison pluvieuse (avril à juillet) pour deux séances de capture par mois.....	105
Tableau XIV: Densités des femelles de <i>An. gambiae</i> au repos dans les habitations humaines et densités par pièges fenêtres selon les localités et les zones écologiques.....	107
Tableau XV: Etat physiologique de l'abdomen des femelles de <i>An. gambiae</i> récoltées dans les maisons et leur degré d'endophilie.....	108
Tableau XVI: Densités agressives moyennes et taux d'endophagie des femelles de <i>An.gambiae</i> capturées selon les localités et les zones écologiques.....	110

Tableau XVII: Taux de parturité et taux d'inoculation entomologique de <i>An. gambiae</i> collecté par la capture sur homme dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè (Janvier à Juillet 2008).....	113
Tableau XVIII: Taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> observé après 1heure d'exposition aux insecticides : perméthrine (0.75%), bendiocarb (0.1%), DDT (4%) et deltaméthrine (0.05%) dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè de Janvier à Juillet 2008.....	115
Tableau XIX: Espèces, formes moléculaires, fréquences <i>kdr</i> et <i>ace-1^R</i> , allèles et génotypes de <i>An. gambiae s.l.</i> collecté dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè de Janvier à Juillet 2008.....	116
Tableau XX: Réduction du taux d'entrée de <i>An. gambiae</i> avant et après intervention dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	125
Tableau XXI: Taux d'endophilie de <i>An. gambiae</i> observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	126
Tableau XXII: Taux de gorgement de <i>An. gambiae</i> observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	127
Tableau XXIII: Taux de gravidité de <i>An. gambiae</i> observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	128
Tableau XXIV: Taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	129
Tableau XXV: Taux d'agressivité des Culicidés et pourcentage de réduction observés avant et après intervention dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	134
Tableau XXVI: Taux d'agressivité, taux d'inoculation entomologique de <i>An. gambiae</i> et pourcentage de réduction observé avant et après PID dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	136
Tableau XXVII: Taux d'agressivité, taux d'inoculation entomologique de <i>An. gambiae</i> et pourcentage de réduction observé avant et après distribution des MIILDs dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	137
Tableau XXVIII : Variation du taux de parturité de <i>An. gambiae s.l.</i> collecté avant et après intervention dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.....	139
Tableau XXIX: Incidence d'accès palustres en fonction des classes d'âges et des communes avant et après intervention.....	140
Tableau XXX : Taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> sauvage et <i>An. gambiae "Kisumu"</i> exposé aux différents supports imprégnés de bendiocarb, en fonction du temps et des tours de traitement.....	146

Tableau XXXI : Temps (en nombre de jours) au bout duquel 80% des moustiques exposés aux supports traités sont susceptibles de mourir selon les différents tours de traitement.....	147
Tableau XXXII: Résultats des bioessais effectués avec des <i>An. gambiae</i> sensible et sauvage sur les moustiquaires Permanet2.0 en fonction de la durée d'utilisation.....	149
Tableau XXXIII: Espèces, formes moléculaires, mutations <i>kdr</i> et <i>ace-1^R</i> de <i>An. gambiae s.l.</i> collecté sur homme.....	155
Tableau XXXIV : Fréquences <i>kdr</i> des survivants de <i>An. gambiae s.l.</i> 24 h après leur exposition aux insecticides.....	158
Tableau XXXV: Fréquences <i>kdr</i> des morts de <i>An. gambiae s.l.</i> 24 h après leur exposition aux insecticides.....	159

Liste des annexes

Annexe 1 : Articles publiés

Annexe 2 : Protocoles

Je dédie ce travail
à mon Feu Père
Eugène Léonard PADONOU
qui m'a fortement encouragé lors de mes premiers pas dans la recherche.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sous la direction du Professeur Martin AKOGBETO, dans le cadre de la mise en œuvre pour la première fois, de la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide contre les vecteurs du paludisme au Bénin. Il a bénéficié d'un appui financier de l'Initiative Présidentielle de lutte contre le Paludisme (PMI) du Gouvernement Américain que je remercie. Merci à l'Organisation Ouest Africaine de la Santé qui a assuré les frais de transport et de séjour de mon stage sur les techniques de PCR et d'ELISA à l'Université du GHANA durant la période de Janvier à Avril 2010.

Les activités qui ont conduit à la rédaction de la présente thèse ont bénéficié du soutien constant de mon directeur de thèse et de l'encouragement de plusieurs personnes. C'est pour moi une entreprise heureuse et un plaisir de leur témoigner mes remerciements. Je voudrais particulièrement remercier :

-Son Excellence Madame le Ministre de la Santé, Dorothée A. KINDE GAZARD pour tous les efforts personnels qu'elle a accomplis pour la mise en œuvre de la campagne de pulvérisation intradomiciliaire (PID) et de distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILDs) dans l'Ouémé . Merci aussi pour avoir accepté de participer au jury de la présente thèse.

-Monsieur Martin AKOGBETO, Professeur titulaire au Département de Zoologie et de Génétique à l'Université d'Abomey-Calavi et Directeur du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, pour tous les efforts personnels et les moyens mis à ma disposition pour la réalisation de cette thèse. Très cher Maître, depuis ma formation de DEA en Environnement et Santé à l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire (EDP) de la Faculté des Lettres Arts et Sciences Humaines (FLASH), votre confiance à mon égard a été le véritable levier de mon désir à collaborer avec vous. Travailler sous votre direction a été un plaisir et un honneur. Vous remercier de n'importe qu'elle manière ne pourrait jamais être à la taille de l'éducation et de la joie que j'ai reçues de vous. Votre excellente qualité dans la gestion des ressources humaines et matérielles, votre amour pour le travail très bien fait, votre rigueur scientifique et l'endurance dont vous faites preuve sont des exemples que je vais essayer de suivre. Je voudrais vous dire aussi sincère merci, pour mon initiation progressive à la carrière d'Enseignant-

Chercheur que je voudrais en toute sincérité poursuivre et valoriser à vos côtés à cause de vos excellentes qualités.

-Madame Isabelle GLITHO, j'ai participé à quelques soutenances de thèse que vous aviez présidées au Bénin et profité de vos bons conseils, merci pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury qui évalue ma thèse.

-Monsieur Karim DRAMANE, vous m'aviez enseigné la physiologie animale en CBG 2 et en année de Maîtrise ès Sciences Naturelles. Vous êtes pour moi, un modèle à suivre. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

-Monsieur Ousmane FAYE, vous avez souvent contribué par l'apport de vos riches expériences en matière de lutte antivectorielle, au renforcement de la lutte contre le paludisme au Bénin. C'est dans ce cadre que j'ai plusieurs fois bénéficié de vos précieux conseils. De nouveau vous aviez accepté, d'être rapporteur de la présente thèse, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

-Monsieur Sahidou SALIFOU, vous avez été le Président du jury ayant évalué mon mémoire de Master d' Entomologie Médicale et Vétérinaire, vous m'avez encouragé à continuer à travailler en mettant en œuvre vos précieux conseils. Vos vœux ont été exaucés et vous avez accepté d'être rapporteur de cette thèse, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

- Monsieur Fabrice Chandre, chercheur dans l'unité de recherche MIVEGEC/IRD je vous remercie très sincèrement pour tous les sacrifices que vous aviez faits dans le cadre de cette thèse. Merci aussi, d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs.

-Monsieur Michel BOKO, Directeur du CIFRED, c'est sous votre direction que j'ai fait mes premiers pas dans la recherche à l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire de la FLASH et obtenu mon DEA en Environnement et Santé. C'est avec vous que j'ai démarré mes premiers travaux de thèse à l'EDP sur " Les risques pathologiques liées à la gestion des eaux dans la basse vallée de l'Ouémé : cas du paludisme et de l'ulcère de buruli". Mais pour des raisons de financement, nous n'avons pas pu aller au bout de nos travaux. Merci de m'avoir gentillement autorisé à me réinscrire à la FAST auprès du Professeur Martin AKOGBETO chez qui les conditions favorables m'étaient offertes, pour entreprendre de nouveaux travaux dans le domaine de l'Entomologie

Médicale et Vétérinaire. Merci pour m'avoir fait partager votre expérience et votre immense culture scientifique. Je vous en suis très reconnaissant.

- Monsieur Daniel BOAKYE, Chef du département de parasitologie de Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR) à l'Université du GHANA, merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire pour ma formation en Techniques de PCR et d'ELISA. Merci pour tous les efforts fournis afin de rendre mon séjour agréable et fructueux, malgré vos multiples occupations.

- Monsieur Emile FIOGBE, Chef du Département de Zoologie et de Génétique, vous avez été mon professeur en 1ère année de Master d' Entomologie Appliquée et m'avez souvent encouragé par de précieux conseils. Je vous en remercie très sincèrement.

- Monsieur Julien DOANNIO, vous avez été mon professeur en 2^{ème} année de Master d'Entomologie Appliquée et m'avez fortement soutenu par de sages conseils. Merci pour vos diverses contributions malgré vos très nombreuses préoccupations.

-Monsieur José QUENUM, cher Professeur, habituellement, je vous appelle Papa. Parce que c'est grâce à vous que je m'étais inscrit pour la première fois au 3^{ème} Cycle universitaire auprès du Professeur Michel BOKO. Tout au long de mes études doctorales, vous m'avez apporté un soutien fort et continu qu'aucun mot de remerciement ne peut valoir. Je vous exprime ici toute ma reconnaissance.

- Monsieur Christian DOSSOU, vous avez été mon Professeur en CBG1 et en année de Maîtrise ès Sciences Naturelles. Vous m'avez soutenu durant les moments douteux et exhorté à faire une formation en Entomologie Médicale. Votre vœu a été exaucé. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

- Monsieur Victor ADJAKIDJE vous avez été mon Professeur en CBG2 et en première année de Maîtrise ès Sciences Naturelles. C'est aussi vous qui êtes le premier à faire germer en moi la passion pour les activités de terrain dans le cadre de ma formation pour le Certificat d'Aptitude pour l'Enseignement Secondaire (CAPES) à l'Ecole Normale Supérieure. J'ai beaucoup appris de vous. Ce travail est aussi le fruit de vos efforts. Je vous remercie.

-Monsieur Ernest GOUDEGNON, Directeur de l'Ecole Normale Supérieure de Natitingou, cher Professeur, merci pour tous les conseils et le soutien dont j'ai bénéficié de vous tout au long de mes formations universitaires.

- Messieurs Ambaliou SANNI, Anatole AKOUEGNINOU et Kabirou MOUTAIROU vous avez été non seulement mes Professeurs, mais aussi les dirigeants de mon école doctorale actuelle. Sincère merci pour ma formation et pour avoir toujours répondu à mes sollicitations administratives.
- Monsieur Corneille AHANHANZO, je voudrais particulièrement remercier toi et ton épouse pour votre assistance fraternelle et tes précieux conseils qui m'ont beaucoup reconforté durant les moments difficiles. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.
- Messieurs Georges ACROMBESSI, Lucien Marc OYEDE, Nestor SAKITI, Jean Marc ATEGBO, Clément AGBANGLA, Alexandre DANSI, Ghélus GBEDJISSI, Thierry ALAVO, cette œuvre est le signe que vos efforts pour ma formation n'ont pas été vains. Je voudrais vous dire toute ma gratitude et merci.
- Monsieur Michel SEZONLIN, cher ami, j'ai bénéficié d'une forte assistance morale et de précieux conseils de ta part. Merci pour ton soutien très utile pour la réalisation de ce travail. Je voudrais te dire mille mercis.
- Mesdames Elisabeth ZANNOU BOUKARY et Micheline AGASSOUNON TCHIBOZO, nous avions été des amis d'amphi au cours de notre formation en CBG et de Maîtrise ès Sciences Naturelles, mais le destin a voulu que vous soyez mes aînées dans la recherche. Je voudrais vous dire un sincère merci pour votre humilité et vos diverses contributions à ma formation doctorale.
- Mesdames et Messieurs Marie-Claire Henry, Alain Nahum, Vincent Corbel, Thierry Baldet, Thibaut Martin, Frank Remoué, Cédric Pennetier, Raphaël N'Guessan, Alex Asidi, Luc Djogbénou chercheurs dont j'ai fait la connaissance au CREC. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour notre fructueuse et franche collaboration.
- Monsieur Armel Djènontin, cher ami, j'ai bénéficié de précieux conseils de ta part et nos échanges m'ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Je voudrais te dire un sincère merci.
- Monsieur Anges Yadouléton mon collègue de bureau, je voudrais te dire grand merci pour les moments forts vécus ensemble au cours de mon DEA à la FLASH et de la présente thèse au CREC.

-Mes chers amis Christian Agossou, Rock Aïkpon, Odile Aïmihouè, Cyriaque Azondékon, Maurille Elégbédé, Augustin Koudamiloro, Razaki Ossè, Philémon Tokponnon, Yoa Mario, Yarou Boni de la première promotion de Master d'Entomologie Appliquée de la FAST je voudrais vous dire un chaleureux merci pour rappeler l'ambiance conviviale de nos relations qui sont demeurées très solidaires.

- Je tiens aussi à remercier mesdames et messieurs Yamadjako Médard, Clémence Durand, Balbine Kindji, Noukpo Herbert, Lin Atigli, Agossa Rodrigue, Félix Zouménou, Joseph Chabi, Narcisse Hounmassè, Cyrille Agoli-Agbo, Ibrahim Siddick, Guedou Etienne, Aboubakar Siddick, Arouna Salé, Lazare Houkanrin, Pélagie Boko, Abibatou Odjo, Alia Roland, Vigninou Estelle, Clémence Metonnou, Eugène Zinzalo, Hubert Tagon, Bio Bangana Sahabi, Innocent Djègbé, Emmanuel Elanga, Ola Boussari, Georgia Damien, Jean-Robert Klotoe, Barnabas Zogo, Pape Dramé, Nicolas Moiroux, Azondékon Roseric, Chehouenou Clément, Fagbohoun Josias, Kelomey Audes, Oumbouke Achille, Zogo Barnabas, Abagli Alavo Zita, Fongnikin Augustin, Ole-Sangba-Zelo Marina, Agbanrin Y. Ramziath, Ahounou Daniel, Sovi Arthur, Attolou Roseline, Aïzoun L. Nazaire, Ganhoutode S. Gabriel, Toffodji Ulrich, Gnanguenon Virgile, Govoetchan Renauld, Hounkanrinkpe Firmin, Klotoe Armand, Badirou Kéfilath, Richard Houssou, Faizil Kifouly, Désiré Aikpé, et tous les étudiants en Master d'Entomologie Appliquée, qui sont mes amis et collaborateurs du CREC.

-Messieurs Sébastien Koudénoukpo et Géraldo Houndéton, je voudrais vous dire merci pour votre précieuse contribution à la réalisation des travaux de PCR.

-Une attention particulière à Olivier OUSSOU, avec qui j'ai partagé les souffrances et les joies du terrain pendant plusieurs mois dans le cadre des activités de la présente thèse, mille mercis pour ta précieuse contribution.

-Je remercie les autorités politico-administratives et sanitaires des communes d'Adjohoun, Dangbo, Missérétré, Sèmè, Porto-Novo, les captureurs et toutes les populations de ces 5 communes pour leur collaboration au cours des travaux de terrain.

-Merci à Aubin HOUNSINOU (Ancien proviseur du Lycée Béhanzin) et Gafari LADANY (Actuel Proviseur du Lycée Béhanzin) qui ont répondu promptement et favorablement à mes sollicitations administratives en vue de ma mise en stage, pour la préparation de cette thèse.

-Mes chers collègues professeurs du Lycée Béhanzin, recevez toute ma gratitude pour vos divers soutiens durant la préparation de la présente thèse.

-Mes pensées vont à l'endroit de feu Casimir TOHOUEGNON en ce moment où je rédige cette thèse.

-Messieurs, Yves da CONCEICAO, Evelyne FASSINOU, Emmanuel SOULEMANE, Joachim HOUNKPATIN, Armand KOKOU et Bonaventure TINDJAN. Merci pour l'encouragement et les soutiens moral et financier dont vous m'avez fraternellement comblé.

-Mes chers collègues auteurs de cahiers d'activités des collections Oiseau Bleu et Union, je voudrais vous témoigner ma reconnaissance d'avoir supporté mes absences répétées pendant plusieurs années et vous dire sincère merci pour vos divers soutiens.

-A tous les membres de mes belles familles SAVI de Hozin et AKINDES d'Allada, sincère merci pour toutes vos contributions.

- Je voudrais tout particulièrement remercier ma chère mère, pour toutes les privations de l'affection filiale dont elle aurait joui, chère maman Gil soit remerciée et reconfortée par la présente thèse qui est aussi le fruit de la souffrance de pépé et toi.

-Je voudrais aussi remercier en priorité ma chère Olga et mes autres sœurs chéries Gisèle, Nadine, Régine, Aurore, Jocelyne, Sabine, pour tous les sacrifices faits dans le cadre de cette thèse.

-Sylvie ma chère épouse, Gilles, Gildas, Régis, Cédric et Eugène mes chers enfants, vous tous mes neveux et nièces Carolle, Yannick, Fèmi, Vanessa, Kpèssou et Kieron. Vous m'aviez apporté un soutien inestimable. Je n'ai pas assez de mots pour vous exprimer mes remerciements. Je voudrais que le présent travail soit un bon exemple à suivre, en ce qui concerne le courage et la persévérance dont vous devez être habités dans la réalisation de vos œuvres.

- A mes frères de la Génération 2000 à Porto-Novo, à toutes leurs épouses, je vous dis un sincère merci pour les moments de bonheur et de peine que nous partageons fraternellement depuis nos premières années à l'UAC.

-Je dis enfin merci à tous ceux que j'ai omis de citer.

Chapitre 1 : Introduction et généralités

1-Introduction générale

Pour préserver sa santé, l'homme s'est toujours défendu contre les agressions qui nuisent à son confort et à son économie. Dès l'antiquité, les sages recommandaient que la construction des villes et des villages se fasse loin des marécages qui sont des zones favorables à la prolifération des moustiques (Diptères: Culicidés) (Darriet, 1998). En effet, plusieurs maladies infectieuses sont transmises par les moustiques avec parmi elles, la fièvre jaune (*Aedes* sp.), la dengue hémorragique (*Aedes* sp), le chikungunya (*Aedes* sp.), la maladie du West Nile (*Culex* sp), l'encéphalite japonaise (*Culex* sp.), le virus de la Vallée du Rift ainsi que certaines filariose (*Anopheles* sp, *Culex* sp) et le paludisme (*Anopheles* sp) (Kettle, 1995; Gratz, 1999).

L'agent parasite responsable du paludisme est un protozoaire du genre *Plasmodium*. Quatre espèces sont parasites de l'homme : *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. falciparum*. Les espèces *P. malariae* et *P. ovale* ne semblent pas provoquer d'accès grave. Mais les infections à *P. vivax* sont plus sévères et en général non mortelles, alors que *P. falciparum* est dangereux pour les individus non immunisés (Collins et Paskewitz, 1995). En 2009, les cas de paludisme dans le monde ont été estimés à 225 millions avec 781 000 décès (World Health Organization, 2010). L'Afrique est le continent où la transmission est la plus intense (Snow *et al.*, 2005). Au Bénin, le nombre de cas de paludisme enregistrés dans les formations sanitaires de 1981 à nos jours a été le plus important des affections parasitaires. Son incidence pour les deux formes simple et grave est de 139 pour 1000 habitants en 2006 (Ministère de la Santé de la République du Bénin, 2007). Au cours de l'année 2006, le paludisme a été la principale cause de morbidité et de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans dans les formations sanitaires de l'Ouémé et du Plateau (Ministère de la Santé de la République du Bénin, 2007). La lutte contre le paludisme repose sur la lutte contre l'agent pathogène et la lutte contre le vecteur. Au Bénin le principal vecteur qui transmet l'agent pathogène est *Anopheles gambiae* (Akogbéto, 1992).

Pour lutter contre l'agent pathogène on utilise des médicaments ayant pour effet de tuer les parasites, d'empêcher leur reproduction et ou de bloquer leur transmission. Selon les modes d'action on distingue des schizontocides tissulaires (Primaquine , Proguanil, Pyriméthamine), des schizontocides sanguins (Chloroquine, Mefloquine, Quinine, Halofantrine, Quinidine, Sulfonamide), des sporontocides (Primaquine) et des gamétocytocides (Primaquine, Artémesinine).

Pour lutter contre l'agent vecteur, l'usage des insecticides a été le principal moyen utilisé. Cette pratique remonte à l'antiquité et a été l'objet de plusieurs travaux de recherches. Pline l'Ancien (23-79 après Jésus-Christ) recommandait l'usage de l'arsenic comme substance insecticide (Darriet, 1998). Au milieu du XX^e siècle, grâce aux progrès de la chimie organique, de nouveaux insecticides plus rémanents et plus toxiques que les insecticides naturels ont été synthétisés. Ce contexte a favorisé au cours des années 50-60 la mise en œuvre d'un projet ambitieux d'éradication du paludisme basé sur de vastes campagnes de pulvérisation intradomiciliaire (PID), dans différents pays par la chimioprophylaxie et l'utilisation des poudres mouillables ou des émulsions de Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane (D.D.T) et dieldrine (Coosemans, 1978). Ces campagnes ont entraîné une diminution importante de la transmission du paludisme dans de nombreuses régions du monde et ont probablement joué un rôle décisif dans l'éradication du paludisme en Europe et en Amérique du Nord (Najera et Zaim, 2004). Elles ont aussi donné de bons résultats dans certains pays dont le Bénin (Joncour, 1959) et le Madagascar (Rakotomanana, 2001). Mais la communauté scientifique internationale s'est rendue compte que la politique d'éradication prônée n'était pas possible dans les pays tropicaux. Les principales raisons de cet échec étaient la longue persistance du DDT (12 ans) dans l'environnement, les effets nocifs des insecticides sur la santé de l'homme puis l'applicabilité des méthodes de lutte proposées qui ne tenaient pas compte des conditions socio-économiques des populations (Darriet, 1998). A cela il faut ajouter, l'apparition de la résistance au D.D.T et à la dieldrine (Brown and Pal, 1971) largement répandue dans toute l'Afrique principalement chez *An. gambiae*. L'entraînement observé pour l'éradication de la maladie s'est arrêté et a fait place à une politique de contrôle du vecteur, par la promotion d'autres méthodes complémentaires de lutte dont l'utilisation des ennemis naturels de *An. gambiae*. C'est le contrôle biologique faisant appel aux prédateurs ou pathogènes d'insectes, tels que les crustacés et les poissons larvivores (Rivière *et al* 1987 ; Sherratt and Tikasingh, 1989), les nématodes (Rojas *et al.*, 1987 ; Santamaría, 1987), les microsporides (Anthony *et al.*, 1978; Sweeney and Becnel, 1991), les spiroplasmes (Humphery-smith and Chatel, 1991 ; Vorms-le morvan, 1991) ou encore les virus (Lacey, 1982 ; Federici, 1985) et les bactéries entomopathogènes (Nicolas *et al.*, 1987). Ces méthodes ont donné des résultats encourageants au laboratoire mais n'ont toujours pas convaincu de leur efficacité dans les conditions naturelles (Hougard, 1992). A ces méthodes, il faut ajouter celle de l'utilisation des moustiquaires non imprégnées qui constituent une protection efficace contre les nuisances occasionnées par les insectes nocturnes agressifs pour l'homme et contre les piqûres infectantes de nombreux vecteurs de paludisme. C'est au milieu

des années 80 qu'ont été reconnu l'intérêt épidémiologique potentiel et les avantages en santé publique représentés par le traitement des moustiquaires avec un insecticide pyréthrinoïde comme méthode de protection contre le paludisme (OMS, 2003). Les pyréthrinoïdes ont été les seuls insecticides recommandés par l'OMS en raison de leur rapidité d'action, leur effet excito-répulsif, leur faible dose d'utilisation, et leur bonne tolérance pour l'homme (Zaim et Guillet, 2002). A partir de cette période, la Chine, la Gambie (D'Alessandro *et al.*, 1995 ; D'Alessandro *et al.*, 1997), les Iles Salomon et le Viet Nam ont mis en oeuvre des projets d'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) à l'échelle nationale. La Chine et le Viet Nam ont privilégié le traitement des moustiquaires existantes plutôt que la distribution des MII et sont parvenus à des taux relativement élevés de retraitement. Au Burkina Faso dans un village rizicole, l'imprégnation de moustiquaires trouées à 25 mg/m² de deltaméthrine a réduit de 32 % les contacts entre un homme placé sous cette moustiquaire et les moustiques agressifs (Darriet, 1998). En Gambie (D'Alessandro *et al.*, 1995), au Ghana (Binka *et al.*, 1996) et au Kenya (Nevill *et al.*, 1996), l'utilisation des MII a réduit de 50% les épisodes cliniques de paludisme non compliqué dus à *P. falciparum* et à *P. vivax*, tout en réduisant la parasitémie et cela a épargné les enfants âgés de 1 à 59 mois protégés par une MII.

Malheureusement, la résistance de *P. falciparum* aux produits pharmacologiques et celle de *An. gambiae s.s* aux pyréthrinoïdes se sont propagées dans les régions endémiques et de ce fait menacent sérieusement la promotion des moyens de lutte. La résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes est une grande préoccupation à l'heure actuelle en Afrique. Le premier cas en Afrique de l'ouest a été signalé en Côte-d'Ivoire (Elissa *et al.*, 1993). De nombreux autres cas ont été aussi décrits au Kenya (Vulule *et al.*, 1994), au Burkina (Chandre *et al.*, 1999 ; Diabaté, 1999), en Côte-d'Ivoire (Chandre *et al.*, 1999), en Afrique du sud (Hargreaves *et al.*, 2000). Au Bénin, des travaux ont montré que *An. gambiae* a développé une forte résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT avec une fréquence du gène *kdr* très élevée de l'ordre de 80% en milieu urbain de Cotonou (Chandre, 1998 ; Akogbéto et Yacoubou, 1999 ; Akogbéto *et al.*, 2006 ; N'Guessan *et al.*, 2007 ; Djogbénou *et al.*, 2008 ; Yadouléton *et al.*, 2010). Toutefois, malgré la résistance développée par *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes les moustiquaires imprégnées confèrent une bonne protection à travers leurs rôles de barrière mécanique (Curtis *et al.*, 1998).

C'est dans ce contexte de forte résistance des anophèles aux insecticides, que le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Bénin a entrepris, pour compter de l'année 2008, un programme de lutte anti-vectorielle à grande échelle dans le département de

l’Ouémé où deux unités paysagères se distinguent : la vallée et le plateau. L’approche de lutte retenue repose sur deux méthodes : la PID dans tous les ménages des localités du plateau et l’utilisation à grande échelle des moustiquaires imprégnées à longue durée d’action (MIILD) dans les localités de la vallée. Cette approche s’inscrit dans le cadre d’application du plan stratégique national de lutte contre le paludisme au Bénin. Ce plan vise l’atteinte des objectifs du Partenariat « Roll Back Malaria ». Ces objectifs consistent à réduire le nombre de cas et de décès imputables au paludisme d’au moins 50 % d’ici fin 2010 et d’au moins 75 % d’ici 2015 par rapport aux chiffres de 2000 (World Health Organization, 2010). Une des stratégies retenue pour atteindre ces objectifs est la couverture universelle des moyens de prévention et de traitement du paludisme.

En Afrique et en Asie du sud, les méthodes PID et MIILD ont donné de bons résultats (Curtis, 2001). Toutefois, chacune d’elles a ses inconvénients. Si le coût-efficacité varie selon le contexte, il est globalement le même pour chacune des deux méthodes (Curtis, 2001). Mais, le principal problème des MIILDs est la résistance des populations d’anophèles aux pyréthrinoïdes (N’Guessan *et al.*, 2007) qui se propage si rapidement. Pour y remédier des chercheurs ont proposé d’imprégnier les moustiquaires avec des mélanges d’insecticides non pyréthrinoïdes et de répulsifs comme une alternative aux pyréthrinoïdes (Pennetier *et al.*, 2005 ; N’Guessan *et al.*, 2006 ; N’Guessan *et al.*, 2008). Malheureusement, la limite majeure de cette nouvelle stratégie est la faible rémanence des répulsifs sur la moustiquaire (2 à 6 semaines en conditions naturelles selon les études) (N’Guessan *et al.*, 2006; Pennetier *et al.*, 2007). Concernant la méthode PID, auparavant appropriée pour la prévention des épidémies de paludisme et pour des situations particulières d’urgence, elle a été recommandée par l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) depuis janvier 2006 pour toutes les zones d’endémie. Cette méthode qui avait été abandonnée en Afrique, a fait son retour d’abord en Afrique de l’Est et Australe avec un impact significatif sur la baisse de l’incidence du paludisme, puis tout récemment en Afrique de l’Ouest (Faye, 2007) où les programmes nationaux de lutte contre le paludisme ont adhéré entièrement à la mise en œuvre de cette stratégie. Toutefois ces programmes sont confrontés au choix de l’insecticide à utiliser pour le traitement des maisons, à cause de la forte résistance développée par *An.gambiae* vis-à-vis des pyréthrinoïdes. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles molécules insecticides. En attendant ces nouveaux produits, il urge de disposer des non pyréthrinoïdes, pour la gestion de la résistance qui risque de compromettre l’efficacité de la lutte antivectorielle contre le paludisme. Les insecticides disponibles sont les carbamates et les organophosphorés. Ils font actuellement, l’objet d’un regain d’intérêt en santé publique. Déjà les carbamates comme le

propoxur et le bendiocarb furent utilisés en aspersions intradomiciliaires pour lutter contre les vecteurs du paludisme (Carnevale et Mouchet, 1990). Des études en cases expérimentales portant sur l'efficacité résiduelle et l'irritation dues au bendiocarb (Mpofu *et al.*, 1991), ont montré que l'effet létal du bendiocarb sur *An. arabiensis* a été plus prononcé que son effet irritant. Cependant, les implications de ces résultats par rapport à sa faisabilité et le potentiel d'utilisation dans la lutte antipaludique à grande échelle n'ont pas été prouvées. Par ailleurs, un essai de pulvérisation sélective et complète en cases expérimentales a été réalisée dans les Philippines (Asinas *et al.*, 1994) où le bendiocarb s'est révélé très prometteur, tant en termes d'efficacité et de coût-efficacité, pour le contrôle de *An. flavirostris*, aux Philippines. Plus tard, d'autres études réalisées en cases expérimentales ont montré que certains organophosphorés et carbamates étaient particulièrement efficaces sur des populations naturelles de vecteurs fortement résistantes aux pyréthrinoïdes (Kolaczinski *et al.*, 2000 ; Maharaj *et al.*, 2003). En février 2004 sur l'île de Bioko en Guinée équatoriale, la PID à base de bendiocarb a permis de contrôler avec succès *An. gambiae* s.s., *An. funestus* et *An. melas* (Sharp *et al.*, 2007). Au Bénin, des travaux ont été réalisés en cases expérimentales, sur une stratégie de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme par l'association de bâche en polyéthylène traitée à base du bendiocarb avec les moustiquaires imprégnées (Djènontin *et al.*, 2009). Les résultats ont révélé l'efficacité de cette stratégie pour la lutte anti-vectorielle du paludisme. Contrairement à la stratégie du PNLP, la plupart de ces projets de MII et de PID ont été réalisés à petite échelle et n'ont concerné que quelques villages ou un district. Dans le cas de la présente thèse, environ 150.000 lieux de couchage des communes de Adjohoun, Dangbo, Missérétré et Sèmè sont à pulvériser pour protéger 350 000 personnes contre *An.gambiae* fortement résistant aux pyréthrinoïdes. Si le choix d'un insecticide non pyréthrinoïde est fait à travers cette thèse, il est impossible de réaliser la PID dans les villages lacustres des communes choisies pour éviter la pollution des eaux par l'insecticide, lors des opérations de PID. La solution proposée a été la distribution des MIILDs à tous les ménages de ces villages non éligibles pour la PID. Toutes ces stratégies de contrôle des vecteurs basées sur l'utilisation d'insecticides nécessitent une implication des populations concernées. Nous avons donc recherché des informations sur les connaissances, attitudes et pratiques (CAP) de ces populations en matière de lutte contre les moustiques, pour les prendre en compte en vue du succès des interventions de lutte à mener (Kyawt-Kyawt et Alan, 2004). Nous avons aussi, trouvé nécessaire de mener une étude approfondie de la biologie, de l'écologie des vecteurs responsables de la transmission et des mécanismes de résistance vis-à-vis des insecticides dans les communes ciblées. Par conséquent, il nous a fallu mettre en place un suivi régulier

de la dynamique de transmission et de la sensibilité des populations naturelles de *An. gambiae* aux insecticides utilisés. Ces études ont permis d'apprécier l'efficacité de la stratégie et de l'améliorer. Ces informations se justifient parce que les études antérieures (Greenberg *et al.*, 1989; Ongore *et al.*, 1989; Yeneneh *et al.*, 1993; Aikins *et al.*, 1994; Shey *et al.*, 2011) ont en général montré que les données relatives aux connaissances des populations sur la cause du paludisme et les autres déterminants en Afrique sont pauvres. Par ailleurs, très peu de données entomologiques existent pour la région du sud est du Bénin et sont très anciennes (Hamon, 1954 ; Akogbéto, 1992). C'est sur cette base que nous avons choisi d'entreprendre les travaux de cette thèse qui s'intitule : "**Contrôle de *Anopheles gambiae* (Diptera, Nematocera, Culicidae), vecteur du paludisme, par le bendiocarb en pulvérisation intradomiciliaire à grande échelle dans le département de l'Ouéma au Bénin**"

Ce thème est justifié par les hypothèses ci-après :

-Hypothèse principale : le bendiocarb en aspersion intradomiciliaire est une alternative potentielle de lutte contre *An. gambiae* dans une zone de forte résistance de cette espèce aux pyréthrinoïdes.

-Hypothèses secondaires :

- les connaissances des mesures de lutte contre le paludisme facilitent l'acceptabilité de la PID par les communautés;
- la zone d'étude choisie remplit les conditions entomologiques et les caractéristiques de l'habitat pour la mise en œuvre de la PID ;
- l'action létale du bendiocarb varie selon les supports imprégnés ;
- le bendiocarb est efficace sur les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes et par conséquent réduit la transmission du paludisme ;
- l'utilisation du bendiocarb à grande échelle peut freiner l'évolution de la résistance aux pyréthrinoïdes de *An. gambiae*.

Le principal objectif visé par la présente étude est d'évaluer l'impact d'un non pyréthrinoïde en pulvérisation intradomiciliaire à grande échelle sur la transmission du paludisme et l'évolution de la résistance dans les communes sous PID.

Pour atteindre cet objectif, nous avons subdivisé l'étude en 3 parties :

-Dans un premier temps (chapitre 2) nous avons évalué en cases expérimentales l'efficacité de la K-Othrine WG 250 (Deltaméthrine 250g/kg), de Ficam M (Bendiocarb 800g/kg), de Fendona 5WP (Alpha-cyperméthrine 50g/kg), de Sumithion 40 WP (Fénitrothion) et de

Master Quick ZC (un mélange Chlorpyriphos 250g/l + Deltaméthrine 12g/l) contre les moustiques résistants. Cette évaluation a pour but de conduire au choix d'un insecticide non pyréthrinoïde pour l'aspersion intradomiciliaire (**Article 1**).

-Dans un deuxième temps (chapitre 3) nous avons recueilli des données de base sur la transmission du paludisme en prélude à la campagne de PID et à l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées (Permanet 2.0) dans la zone d'étude. Cela a permis d'apprécier les expériences de la population d'étude sur le contrôle des moustiques et leur degré d'adhésion à la PID (**Article 2**) puis de savoir les informations sur la biologie du vecteur cible et sa sensibilité aux insecticides (**Article 3**) avant la mise en œuvre de la stratégie.

-Enfin dans un troisième temps (chapitre 4) nous avons conduit une étude sur l'impact de la PID et de l'utilisation généralisée des MIILDs. Dans ce chapitre les travaux ont été organisés en 4 étapes :

La première étape a été consacrée aux effets du bendiocarb et de la couverture totale en Permanet 2.0 sur le comportement de *An. gambiae*. Il s'agit des changements de comportement exophage et exophile du vecteur en réponse à l'application du bendiocarb sur les murs (**Article 4**). Ensuite l'étude de l'impact de la PID au bendiocarb et de la couverture totale en Permanet 2.0 sur la transmission du paludisme a été réalisée (**Article 5**). Elle a pour but d'évaluer la baisse de la longévité et de l'infectivité du vecteur. Enfin une étude sur la rémanence du bendiocarb sur les supports imprégnés pour apprécier la durée d'efficacité résiduelle du bendiocarb sur les murs (**Article 6**) et une autre sur l'évolution de la résistance de *An. gambiae* aux insecticides dans les zones sous intervention ont été réalisées (**Article 7**).

2- Généralités

2-1- Epidémiologie du paludisme

2-1-1- Répartition du paludisme dans le monde

Le paludisme est endémique dans différentes zones du monde en l'occurrence les zones intertropicales. A l'heure actuelle, cette maladie continue de sévir en Amérique, en Asie, et en Afrique (Figure 1). Cependant, c'est en Afrique sub-saharienne que l'on trouve 85 à 90 % des morts du paludisme (Layne, 2005). La distribution géographique du paludisme est complexe. On trouve en effet des zones paludiques et non-paludiques proches l'une de l'autre.

Les niveaux d'endémie et de transmission du paludisme sont très variables au sein d'un même pays et même dans une région relativement petite. Les niveaux d'endémie et de transmission dépendent de facteurs climatiques que sont la température et la pluviométrie, puis des facteurs démographiques tels que les modes d'utilisation des terres agricoles, l'irrigation, l'urbanisation et l'activité économique. Selon l'OMS (2003) on distingue les niveaux ci-après :

- **Le niveau holoendémique** caractérisé par une forte transmission pérenne du paludisme provoquant une immunité importante dans toutes les classes d'âge, surtout chez les adultes (le taux parasitaire constamment supérieur à 75% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans).
- **Le niveau hyperendémique** caractérisé par une transmission intense mais saisonnière et où l'immunité est insuffisante pour prévenir les effets du paludisme dans toutes les classes d'âge (taux parasitaire constamment supérieur à 50% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans).
- **Le niveau mésoendémique** caractérisant les communautés rurales avec une transmission d'intensité variable (taux parasitaire situé entre 11 et 50% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans).
- **Le niveau hypoendémique** caractérisé par une transmission faible dans les milieux où le paludisme ne touche pas la population générale de façon significative (taux parasitaire inférieur à 10% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans).

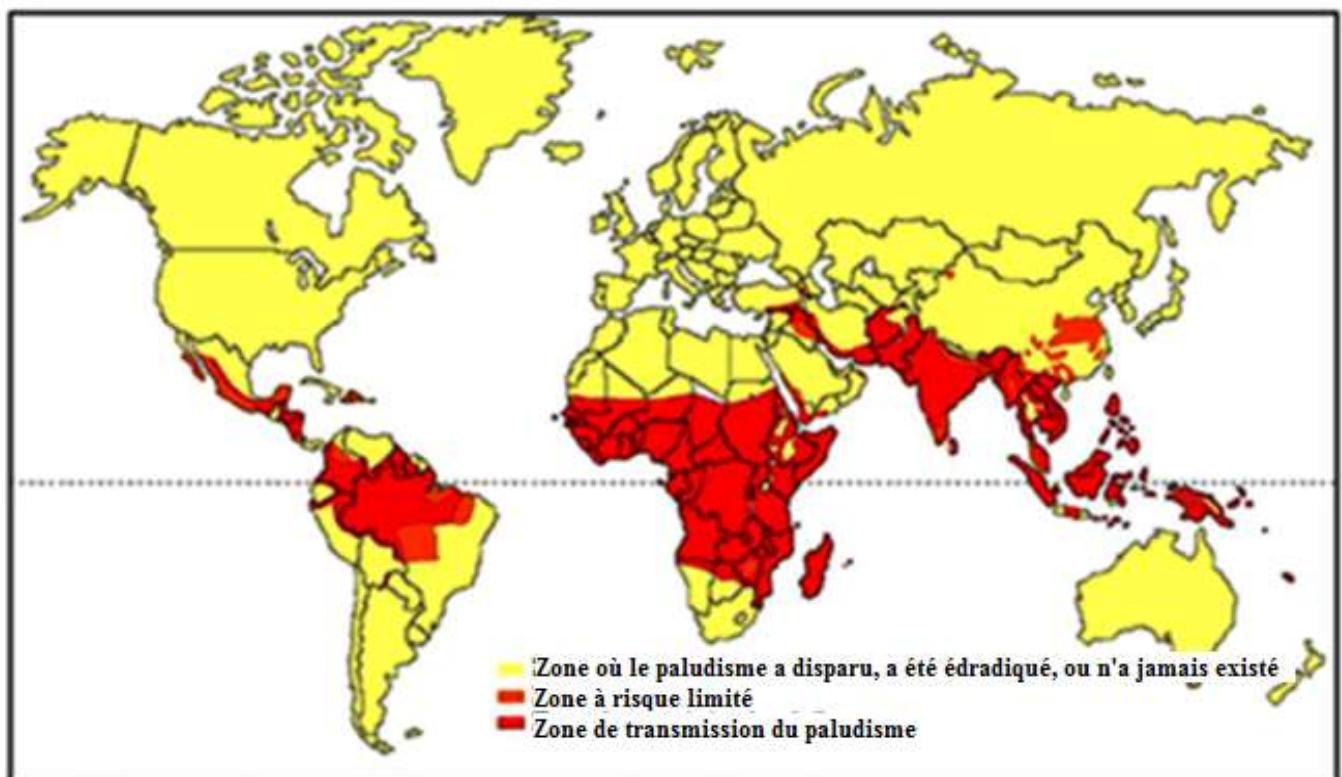


Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde (OMS, 2003)

Le paludisme est une maladie parasitaire à transmission vectorielle. Il dépend de ce fait de 3 "protagonistes" que sont l'homme, le parasite et le vecteur.

2-1-2- Les parasites

On pensait à l'origine que le paludisme provenait des zones marécageuses, d'où son dérivé du mot ancien 'palud', marais. C'est en 1880 que Laveran a découvert la véritable cause du paludisme, un parasite unicellulaire du genre *Plasmodium*. Ce parasite est un protozoaire de type sporozoaire appartenant à l'ordre des Haemosporididae. Trois espèces spécifiquement humaines sévissent en Afrique. Il s'agit de *Plasmodium falciparum* (la forme pernicieuse), *P. vivax* et *P. ovale* (formes plus bénignes). Une quatrième espèce, *P. malariae* est à la fois commune à l'homme et aux grands singes africains (Mazier, 1991). Ces quatre espèces plasmodiales, parasites intracellulaires, ont une multiplication asexuée chez l'homme et une multiplication sexuée chez le moustique femelle (figure 2). A la suite de la piqûre d'un homme infecté, les parasites au stade de gamétocytes sont ingérés par le moustique et forment des gamètes dans l'estomac de l'anophèle. Ces gamètes mâle et femelle vont se féconder pour donner un zygote mobile appelé ookinète. Ce dernier pénètre la paroi de l'estomac de l'anophèle et devient un oocyste sphérique. A l'intérieur de ce dernier, le noyau subit plusieurs divisions (sporogonie) et forme de nombreux sporozoïtes et l'oocyste grossit. Lorsque les sporozoïtes sont complètement développés, l'oocyste se rompt et libèrent les sporozoïtes qui migrent alors vers les glandes salivaires. A ce niveau, ils deviendront matures. La durée du cycle sporogonique varie selon la température et l'espèce plasmodiale. Elle est de 12 jours pour *P. falciparum* en Afrique tropicale (Gentilini, 1993). Ces sporozoïtes sont injectés dans le sang avec la salive du moustique lorsqu'il pique un homme. Par voie sanguine, ils atteignent alors le foie, où ils se multiplient durant une période de 7 à 12 jours. Ces multiplications donnent des merozoïtes qui sont libérés dans la circulation sanguine et envahissent les globules rouges à l'intérieur desquels ils croissent et donnent des trophozoites. Ceux-ci se multiplient par schizogonie. Chaque cycle schizogonique dure environ 48 heures. Après plusieurs cycles schizogoniques apparaissent dans les hématies les gamétocytes mâles et femelles. En prenant son repas sanguin sur un paludéen, l'anophèle femelle absorbe les gamétocytes mâles et femelles et un nouveau cycle recommence.

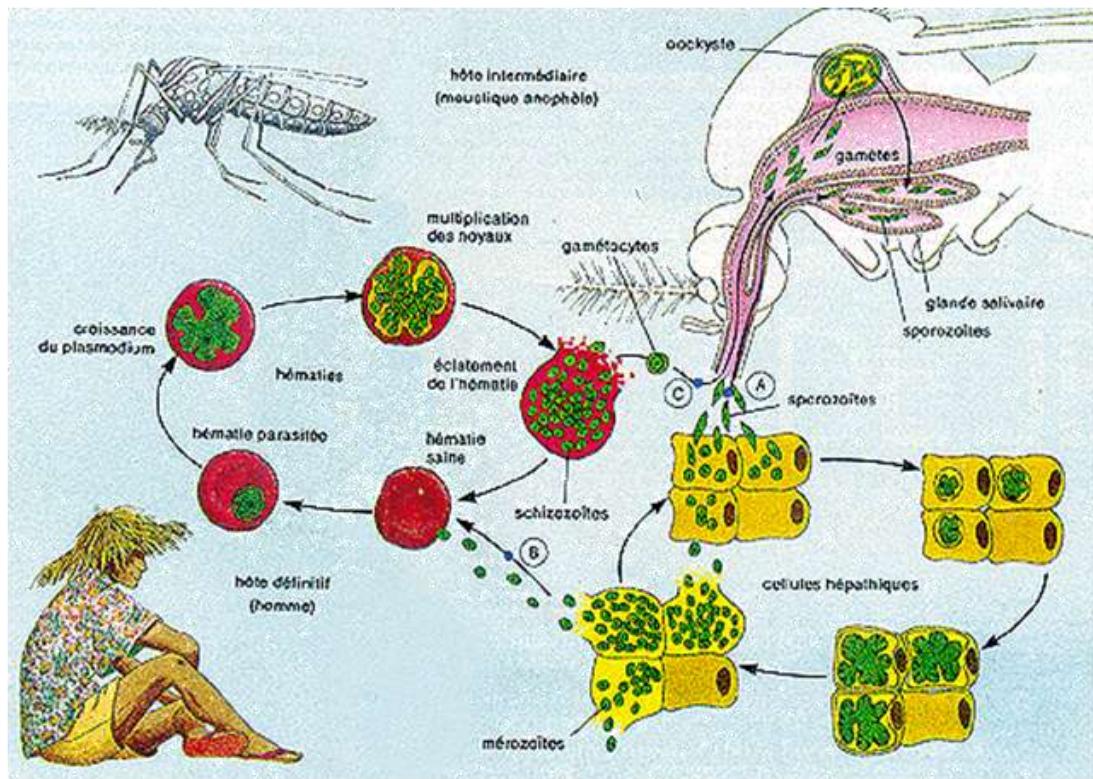


Figure2 : Cycle de développement du *P. falciparum* (Ghosh *et al.*, 2000)

2-1-3-Les anophèles vecteurs

2-1-3-1-Taxonomie

La position systématique des anophèles se présente comme suit:

- Règne : Animal
- Embranchement : Arthropodes
- Sous-embranchement : Antennates
- Classe : Insectes
- Sous-classe : Ptérygotes
- Super-ordre : Mécoptéroïdes
- Ordre : *Diptera* (LINNE, 1758)
- Sous-ordre : *Nematocera* (LATREILLE, 1825)
- Famille : *Culicidae* (LATREILLE, 1825)
- Sous-famille : *Anophelinae* (THEOBALD, 1905)
- Tribu : *Anophelini* (BELKIN, 1962)
- Genre : *Anopheles*

2-1-3-2-Répartition dans le monde

Il existe 484 espèces d'anophèles (Harbach, 2004), dont une soixantaine assurent, la transmission des plasmodes humaines. Les anophèles ont une répartition quasiment mondiale (Kiszewski *et al.*, 2004) (figure 3) dépendant de la température et de la pluviosité. En Afrique, au sud du Sahara, une dizaine d'espèces d'anophèles est directement impliquée dans la transmission du paludisme mais seuls deux grands complexes d'espèces assurent la presque totalité de cette transmission : *An. gambiae* Giles, 1902 et *An. funestus* Giles, 1900 (Darriet, 1998). Le complexe *An. gambiae* comporte 7 espèces jumelles : *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus A* et *An. quadriannulatus B* (White, 1974, Hunt *et al.*, 1998). Le groupe *An. funestus* quant à lui comporte six espèces jumelles : *An. vaneedeni*, *An. rivulorum*, *An. parensis*, *An. leesoni*, *An. rivulorum-like*, et *An. funestus s. s.*. Seule cette dernière est anthropophage et joue un rôle dans la transmission du paludisme (Darriet, 1998).

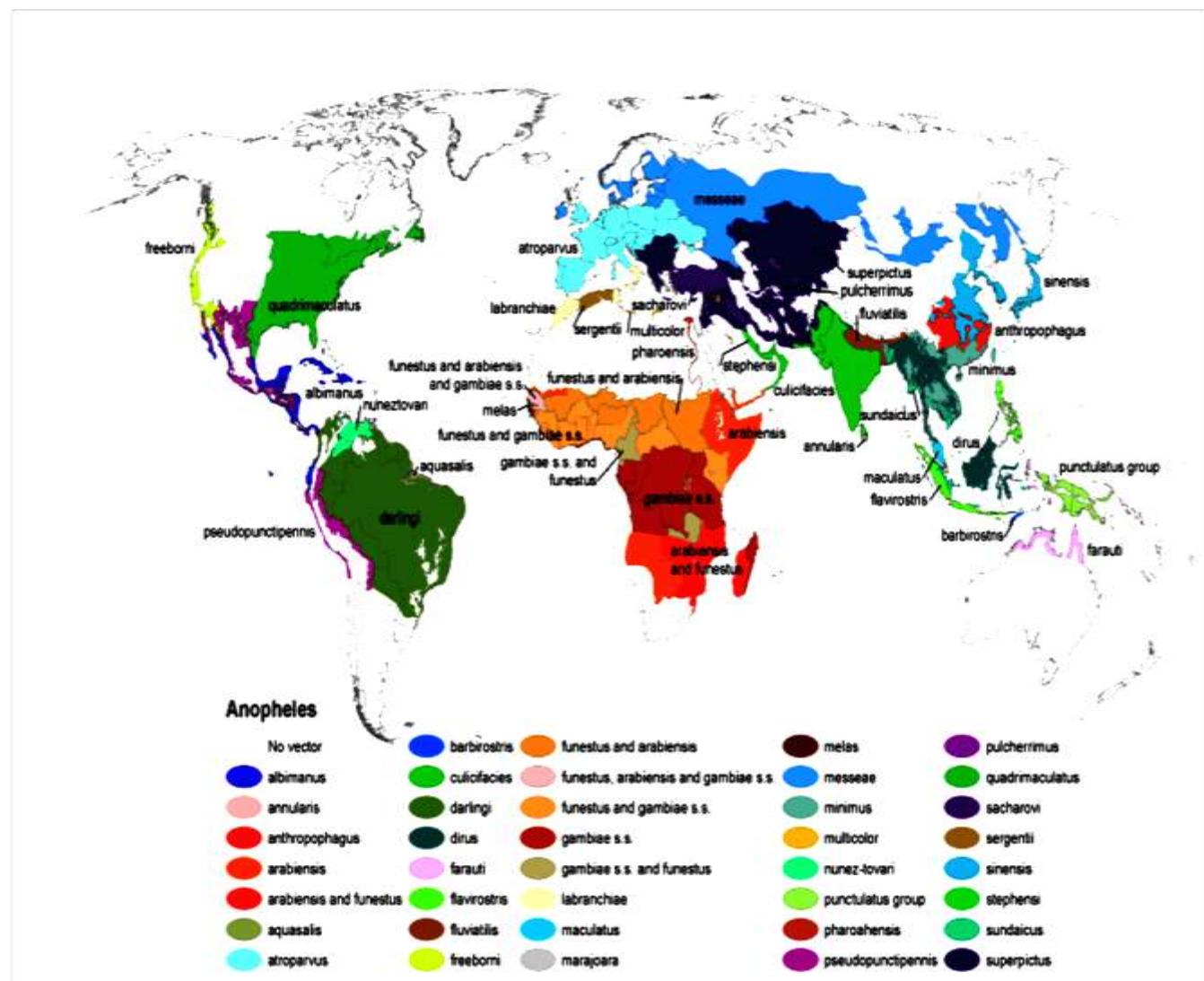


Figure 3 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels (Kiszewski *et al.*, 2004)

2-1-3-3- Distribution du complexe *An. gambiae* au Bénin

Anopheles gambiae s.l est rencontré, dans tous les milieux au Bénin. Sur un total de 3 755 anophèles récoltés au Bénin de septembre 1983 à novembre 1987 suivant un transect sud-nord Bénin-Togo, Akogbéto a obtenu 1 302 *An. melas* soit (34, 67 %), 2 382 *An. gambiae* s.s soit (63,43 %) et 71 *An. arabiensis* soit (1,89 %). Pour *An. gambiae* s.s, le développement d'outils moléculaires d'identification a permis de définir deux formes moléculaires M et S (Della Torre *et al.*, 2001) qui correspondent au Burkina Faso, respectivement aux formes chromosomiques Mopti et Savane (Favia *et al.*, 1997). Les formes moléculaires M et S

présentent des préférences écologiques différentes (Della Torre *et al.*, 2001). Au Bénin, ces formes moléculaires M et S existent toutes deux du Sud au Nord, mais affichent des fréquences très différentes selon les sites écologiques (Djogbénou *et al.*, 2008). *An. gambiae* s.s vit en sympatrie avec *An. melas* en zone côtière au sud du Bénin de même qu'avec *An. arabiensis*, qui est au centre du Bénin à 92% dans Glazoué et Bohicon, puis au nord du Bénin respectivement à 87%, 47% et 13% dans Parakou, Kandi et Tanguiéta (Djogbénou *et al.*, 2008). Par contre, les captures effectuées dans les quartiers périphériques de Cotonou, en bordure du lac Nokoué et à Abomey-Calavi, un centre périurbain de Cotonou, en plein développement situé au bord du même lac sont constitués exclusivement de *An. gambiae* s.s (Akogbéto, 1992). Les villages du type traditionnel, notamment les villages de pêcheurs dans les zones de cours d'eau saumâtre à Ganvié, sont plus favorables à la multiplication de *An. melas*. Le développement des villes telles que Cotonou et Porto-Novo vers leurs périphéries crée de nouveaux gîtes, favorables à *An. gambiae* s.s dont les larves trouvent des conditions de reproduction au détriment de *An. melas*.

2-1-3-4- Biologie de *An. gambiae* s. l.

Anopheles gambiae est un insecte à métamorphose complète, dont le cycle de développement (figure 4) est caractérisé par une phase pré-imaginale aquatique et une phase adulte aérienne. Le développement larvaire de *An. gambiae* s.l. a lieu dans les collections d'eau stagnante, claires, temporaires, peu profondes, calmes, ensoleillées, pauvres en matières organiques et dont la température ne dépasse pas 30°C. Après accouplement, la femelle conserve les spermatozoïdes dans le spermathèque. Pour la maturation de ses œufs, la femelle de *An. gambiae* a besoin d'un repas de sang (Coluzzi *et al.*, 1979). C'est surtout dans la nuit, attirés par le CO₂, que les femelles de *An. gambiae* piquent leurs proies, pour prélever le sang dont elles ont besoin. Pour cela, les anophèles femelles volent vers les habitations humaines, sans s'éloigner de plus de 2 km de leur lieu de reproduction. Cependant, une dispersion passive est assurée par le vent et les moyens de transport. Les femelles de *An. gambiae* s.s peuvent aussi se montrer zoophiles lorsque du bétail se trouve à proximité des zones habitées. Après leur repas de sang, les femelles de *An. gambiae* s. l se reposent à des endroits très variés qui sont sombres, frais et souvent humides. Les abris extérieurs sont moins favorables. *Anopheles gambiae* s. l est dans l'ensemble naturellement endophage et endophile c'est-à-dire que les femelles piquent à l'intérieur des cases d'habitation et y restent pour digérer leur repas de sang. A la différence de *An. gambiae* s.s, *An. arabiensis* est capable de se développer dans

des zones totalement sauvages, adoptant alors un comportement exclusivement zoophile (Duchemin *et al.*, 2001). A cause de ce caractère zoophile *An. arabiensis* est plus exophage et exophile. Mais en milieu côtier lagunaire au Bénin, Akogbeto a montré que *An. gambiae* s.s se nourrit presque exclusivement sur l'homme (80%), *An. melas* se nourrit sur les animaux (> 70%) de préférence sur le porc et que les deux espèces ont des taux de parturité similaires. Cependant *An. melas* de même que *An. arabiensis* ont une potentialité de transmission du paludisme faible par rapport à *An. gambiae* s.s, à cause de leurs caractères exophile et zoophile.

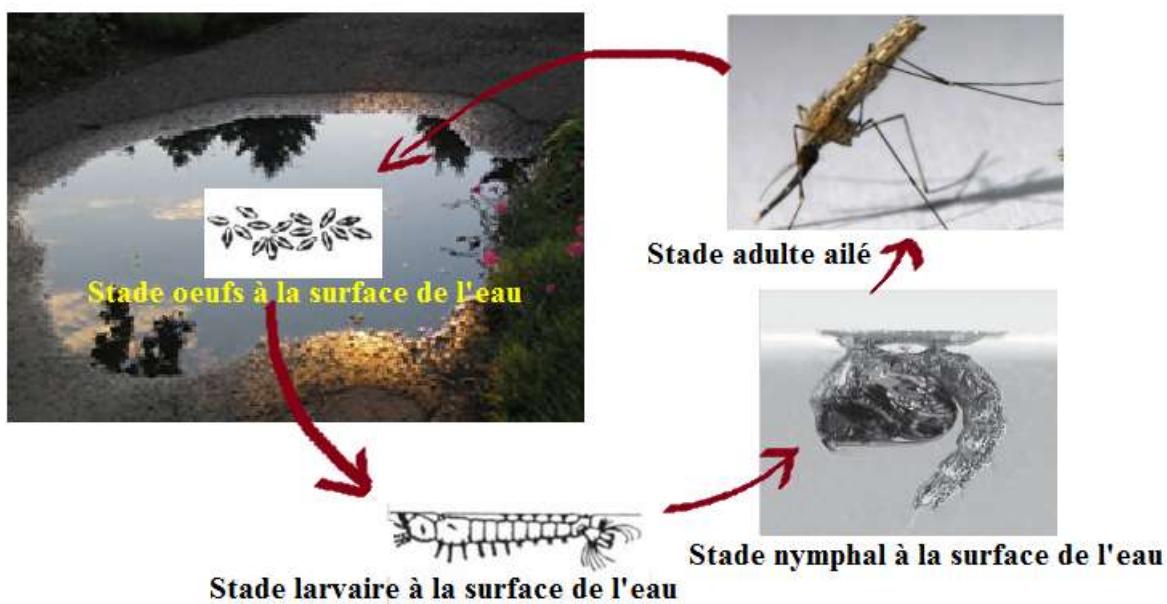


Figure 4 : Cycle de développement de *An. gambiae*

2-2- La lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle est une lutte préventive et intègre une somme de connaissances. Elle ne fait pas appel à une seule méthode standard. Les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme sont basées sur la réduction de leur capacité vectorielle ou de leur compétence vectorielle. La réduction de la compétence vectorielle consiste à développer chez le vecteur un caractère réfractaire vis-à-vis du parasite, *P. falciparum*, et ceci par un contrôle génétique par exemple (Varmus *et al.*, 2003; Clayton, 2006). La réduction de la capacité vectorielle des vecteurs quant à elle consiste à l'aménagement de l'environnement ou à l'utilisation des

ennemis naturels de ces vecteurs et des produits chimiques. L'utilisation de barrières de protection tels que les moustiquaires puis les grillages et rideaux pour portes et fenêtres, en réduisant le contact homme-vecteur contribue aussi à une réduction de la capacité vectorielle des moustiques. La lutte contre les vecteurs peut être dirigée contre les larves ou les adultes.

2-2- 1- La lutte anti larvaire

La lutte anti larvaire se fait par des méthodes mécaniques, chimiques et biologiques. Les méthodes mécaniques sont basées sur l'aménagement de l'environnement à grande échelle par le drainage, l'écoulement des eaux, le remblayage des trous, la destruction des récipients pouvant servir de gîtes et l'intervention sur les rives des rivières et des lacs pour les rendre impropres au développement de l'anophèle. L'utilisation de larvicides tels que le malathion, le théméphos, le Methoxychlore, et le méthyl-Dursban, sont des exemples de lutte chimique contre les larves. Quant à la lutte biologique, elle fait appel à l'utilisation des poissons larvivores (*Gambusia affinis*), des prédateurs invertébrés (*Toxorhynchites*), des parasites (nématodes, protozoaires, champignons) ou des bactéries pathogènes (*Bacillus thuringiensis israeli*, *Bacillus sphaericus*). Malgré les espoirs suscités par cette lutte biologique, la lutte anti larvaire est limitée par des difficultés d'ordre opérationnel telle la rémanence, le coût et les préférences écologiques de certaines espèces comme *An. gambiae s.l* (Carnevale, 1995). En effet, cette espèce peut accomplir son cycle pré imaginal dans des biotopes très variés, des petites flaques temporaires comme les empreintes de pas, les ornières de voitures, les trous d'emprunt de terre, aux vastes zones rizicoles dont les casiers à riz sont propices au développement des larves à certaines périodes de la riziculture (Coosemans, 1985 ; Robert *et al.*, 1988). Une telle multiplicité des gîtes n'est pas favorable pour l'utilisation de la lutte anti larvaire. De plus cette lutte exige une technicité pointue et n'agit que sur la réduction de la densité des anophèles, mais pas de leur longévité. Or, au plan épidémiologique, le paramètre important dans la transmission du *Plasmodium* est la longévité du vecteur (Carnevale, 1995).

2-2- 2- La lutte contre les adultes

2-2- 2-1- La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent

La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent peut être définie comme l'application d'un insecticide liquide qui sèche et forme un dépôt cristallin rémanent sur les

surfaces pulvérisées (Najera et Zaim, 2004). L'application intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent a été la meilleure méthode pour lutter contre les vecteurs du paludisme en Afrique tropicale (Coosemans, 1978). Le choix de l'insecticide et de la formulation à appliquer reposent sur la sensibilité des vecteurs locaux, les caractéristiques des divers composés, le coût et une collaboration soutenue de la population. Il faut également tenir compte d'autres problèmes locaux spécifiques, tels que les contaminations potentielles ou les effets néfastes sur des cultures essentielles pour l'économie locale. En effet, les élevages d'abeilles ou vers à soie, les récoltes conservées dans les greniers pendant de longues périodes, comme lors du séchage du maïs, etc. peuvent être contaminés au cours des pulvérisations. Pour les pulvérisations intradomiciliaires, les produits insecticides recommandés par l'OMS sont mentionnés dans le tableau I ci-après:

Tableau I : Insecticides recommandés par l'OMS pour la pulvérisation à effet rémanent à l'intérieur des habitations contre les vecteurs du paludisme

Insecticides et formulations	Classe	Dosage (g/m ²)	Rémanence (mois)
Alpha cyperméthrine PM et SC	P	0,02–0,03	4–6
Bendiocarbe PM	C	0,1–0,4	2–6
Bifenthrine PM	P	0,025–0,05	3–6
Cyfluthrine PM	P	0,02–0,05	3–6
DDT PM	OC	1–2	> 6
Deltaméthrine PM, GDE	P	0,020–0,025	3–6
Etofenprox PM	P	0,1–0,3	3–6
Fénitrothion PM	OP	2	3–6
Lambda-cyhalothrine PM	P	0,02–0,03	3–6
Malathion PM	OP	2	2–3
Pirimiphos-méthyl PM et CE	OP	1–2	2–3
Propoxur PM	C	1–2	3–6

CE (concentré émulsionnable) ; GDE (granules dispersibles dans l'eau) ; PM (poudre mouillable) ; SC (suspension concentrée) ; OC (organochloré) ; OP (organophosphoré) ; C (carbamate) ; P (pyréthrinoïde). (Najera et Zaim, 2004)

Cette application intradomiciliaire d'insecticide induit une mortalité très importante des vecteurs adultes en réduisant leur longévité et par conséquent la probabilité que le *Plasmodium* puisse achever son développement en leur sein. De cette façon, cette méthode baisse le taux d'agressivité pour l'homme ainsi que l'espérance de vie infectante du vecteur, deux facteurs déterminants de sa capacité vectorielle (Mac Donald, 1956 ; Gillies et de Meillon, 1968). Mais l'application intradomiciliaire d'insecticide est trop onéreuse et présente l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages et/ou exophiles, qui

continuent de prendre des repas sanguins, assurant ainsi un niveau minimal de transmission (Curtis et Mnzava, 2001).

2-2-2-2- L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action

La deuxième méthode aussi efficace pour la lutte imagocide est celle de l'utilisation à grande échelle des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action. Cette stratégie qui vise à établir une barrière (physique et/ou chimique) entre l'homme et le moustique est utilisée depuis longtemps pour se protéger des piqûres de moustiques (Snow *et al.*, 1987). L'efficacité des moustiquaires a été renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticides (Darriet *et al.*, 1984). Actuellement, cette imprégnation se fait au moyen des pyréthrinoïdes qui sont les seuls insecticides recommandés pour le traitement des moustiquaires. Le tableau II énumère les insecticides recommandés par l'OMS pour le traitement des moustiquaires. Il convient de relever que les pyréthrinoïdes énumérés ont un effet excito-répulsif important, mais spécifique pour la plupart des espèces de vecteurs. L'imprégnation réalisée à l'aide de ces pyréthrinoïdes protège efficacement le dormeur d'une barrière chimique qui renforce la barrière physique souvent affaiblie par les trous et les déchirures. L'effet létal de l'insecticide contribue à faire baisser la densité des vecteurs et le taux d'agressivité. Alors que l'effet répulsif de l'insecticide empêche les piqûres à travers la moustiquaire et la pénétration des moustiques à travers les trous. Cette utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides est une mesure de protection personnelle efficace. Plusieurs études effectuées sur les évaluations de moustiquaires imprégnées de perméthrine et de deltaméthrine au niveau de villages ont donné des résultats prometteurs (Carnevale *et al.*, 1988 ; Li zuzi *et al.*, 1987 ; Snow *et al.*, 1988). Mais, la nature nomade de certains groupes ethniques, les habitudes culturelles des paysans, les habitudes des villageois à dormir hors de leur case pendant les périodes de chaleur et les représentations liées aux croyances sont autant de barrières qui peuvent rendre inefficaces l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. A cela s'ajoute son coût élevé, car elle reste pour beaucoup de gens résidant dans les zones rurales, inaccessible car trop onéreuse. Par contre, en milieu urbain où les revenus et le niveau de vie sont supérieurs, l'usage de la moustiquaire imprégnée pourrait être généralisé afin de protéger efficacement les populations contre les moustiques (Hougard, 1991).

Tableau II : Insecticides recommandés par l'OMS pour le traitement des moustiquaires

Insecticide ^a	Dosage (Substance active en mg/m ² de tulle)
Alpha-cyperméthrine 10% SC	20-40
Cyfluthrine 5% EW	50
Deltaméthrine 1% SC et CP 25%	15-25
Etofenprox 10%EW	200
Lambda-cyhalothrine 2,5% CS	10-15
Perméthrine 10% CE	200-500

SC = suspension concentrée aqueuse ; EW = émulsion, huile dans l'eau ; CP = comprimé à disperser dans l'eau ; CS = suspension en capsule (micro-encapsulée) ; CE = concentré émulsionnable. (Najera et Zaim, 2004)

2-2-2-3- Autres méthodes de lutte contre les adultes

La lutte contre les adultes peut aussi se faire au moyen de répulsifs qui sont des produits naturels ou des produits de synthèse. Ces produits présentent des propriétés excito-répulsives contre les insectes piqueurs. On peut les appliquer directement sur la peau sous forme de crème, lotion, ou aérosol ou sur les vêtements. C'est une pratique ancestrale qui mettait en jeu des dérivés de plantes. Elle a connu un véritable développement avec l'apparition des produits de synthèse à action prolongée, non toxiques, acceptables en applications cutanées, et efficaces contre de nombreux insectes, plus particulièrement depuis la découverte du diéthyl-m-toluamide ou DEET en 1953 (McCabe *et al.*, 1954). Actuellement, de nouvelles substances actives sont commercialisées (N-buthylacetylaminopropionate) et ont montré des performances intéressantes sur les insectes nuisants et/ou vecteurs de maladies (Nentwig, 2003; Badolo *et al.*, 2004; Lundwall, *et al.*, 2005). Cette méthode peut être utilisée en complément aux moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes et aux pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides (Pennetier, 2005). Des études réalisées au Burkina Faso ont également montré que l'application de répulsifs pouvait réduire significativement le nombre de piqûres infectantes à *P. falciparum*, agent responsable de la forme grave du paludisme (Costantini *et al.*, 2004). Malgré cela, ces composés n'ont jamais été utilisés en santé publique, en l'absence de preuves tangibles sur leur capacité à réduire la transmission du paludisme.

Les habitudes de toilette, les périodes de chaleur, les représentations liées aux croyances, la faible rémanence et le coût élevé pour les populations rurales sont autant de barrières qui peuvent rendre inefficaces l'utilisation des répulsifs.

Ajoutons aussi que sous les tropiques, les populations mènent la lutte contre les moustiques en utilisant des diffuseurs d'insecticides volatils en particulier sous forme de serpentins antimoustiques et de diffuseurs électriques. En outre, les populations assurent la protection des habitations par la pose de grillages sur les fenêtres, les avant-toits et les portes. C'est une méthode efficace si elle est appliquée et maintenue correctement. Elle constitue presque exclusivement une méthode de protection individuelle et familiale, mais nécessite un investissement important et entraîne des coûts d'entretien élevés (Najera et Zaim, 2004).

La lutte contre les vecteurs du paludisme, peut être aussi menée, en utilisant des moustiques transgéniques qui, à l'issue de manipulations génétiques, ne pourraient plus assurer l'accomplissement du cycle sporogonique du *Plasmodium* (Collins *et al.*, 1986 ; Collins, 1994 ; Crampton *et al.*, 1992 ; Curtis, 1994). Cependant, il faut considérer cette méthode comme à un stade de recherche et non opérationnelle dans le contexte habituel du terrain (Spielman, 1994).

2-2-3- Les procédures de gestion des insecticides en santé publique

L'utilisation des pesticides à des fins de santé publique s'effectue dans les lieux où résident des êtres humains et il est important d'en assurer une bonne gestion. Cette utilisation doit être confiée à un service central de lutte contre les vecteurs et les nuisibles. Il y a donc nécessité urgente de le créer s'il n'existe pas ou de le renforcer s'il existe déjà. Son rôle est de guider, de soutenir, de superviser et de surveiller les activités de lutte antivectorielle sur l'ensemble du territoire national. Sa direction doit être confiée à des professionnels de la lutte antivectorielle. Outre le fait que les programmes de lutte contre les maladies à transmission vectorielle ne disposent que de ressources limitées, l'arsenal de pesticides agréés présentant toutes les garanties de sécurité et d'efficacité tend à se réduire, ce qui oblige à utiliser ces produits de manière judicieuse et sélective dans le cadre de la gestion intégrée des populations de vecteurs (WHO, 2003). Cela exige alors une collaboration intersectorielle entre le ministère de la santé et ceux de l'agriculture et de l'environnement ou avec d'autres partenaires également concernés. L'OMS a défini des principes généraux à respecter, malgré les politiques générales adoptées dans ce domaine par certains pays. Ces principes sont : le contrôle législatif, les mécanismes administratifs, l'homologation, l'acquisition, le stockage et

le transport, la distribution, l'épandage, la conservation et l'élimination ainsi que le contrôle et la surveillance des produits, la gestion du problème de la résistance et le contrôle de qualité.

2-2-3-1- Homologation des produits

Chaque Etat membre de l'OMS devrait inclure dans sa législation sur les pesticides des dispositions permettant de faire en sorte que la délégation d'autorité pour la surveillance des pesticides, la promulgation de la réglementation et le contrôle de son application soient accordés à un seul et même service. Ce service serait chargé de veiller à ce que l'utilisation des pesticides par des organismes publics, des firmes commerciales ou des particuliers soit conforme aux normes nationales prescrites. Au Bénin, ce service est le Comité National d'Agrément et de Contrôle des Produits Phytopharmaceutiques (CNAC). Les dispositions législatives particulières qui sont prises concernant les pesticides utilisés en santé publique, sont contenues dans la loi n° 91-004 du 11 février 1991 portant réglementation phytosanitaire en République du Bénin.

2-2-3-2- L'acquisition des pesticides

L'acquisition des pesticides est une opération très spécialisée et complexe. Les commandes doivent être faites suffisamment à l'avance pour que les stocks soient reconstitués à temps. C'est à un personnel expérimenté et compétent qu'il faut confier les achats de produits destinés à la lutte antivectorielle. L'appui technique, la formation, le recyclage des produits et l'élimination des récipients vides sont des activités qui font partie du service après-vente attendu des fabricants et doivent être spécifiées dans les appels d'offres selon les directives nationales applicables aux achats de produits destinés à la lutte antivectorielle. Aussi l'on doit respecter scrupuleusement des lignes de conduite de l'OMS (WHO, 2003) à adopter pour l'acquisition des pesticides destinés à la santé publique.

2-2-3-3- La qualité du produit et le réemballage

Il est essentiel, pour des raisons d'efficacité mais aussi pour réduire au minimum les risques liés à l'épandage, de n'employer que des produits dont les formulations sont de bonne qualité et dont la teneur en matière active est conforme à celle déclarée. Le réemballage de la formulation peut s'avérer nécessaire au niveau local pour des raisons de distribution. Dans ce

cas, l'industrie doit, en coopération avec les pouvoirs publics, veiller à ce que les opérations d'emballage ou de réemballage s'effectuent conformément aux normes de sécurité en vigueur conformément à la réglementation nationale relative aux pesticides.

2-2-3-4-Le stockage et le transport

Le stockage des pesticides et du matériel d'épandage doit se faire dans des entrepôts situés à distance des habitations humaines ou abris pour animaux, des sources d'eau, des puits et des canaux. Ces entrepôts doivent être ventilés et situés sur une hauteur et sécurisés par des clôtures, avec un accès facile et réglementé pour limiter les risques de pollution et maintenir la qualité du produit. Les pesticides doivent être entreposés à l'abri de la lumière solaire, de l'eau ou de l'humidité. Les récipients contenant les pesticides et les cartons doivent être empilés dans de bonnes conditions de sécurité, en limitant la hauteur des piles pour assurer leur stabilité. Leur transport ne doit pas se faire dans un même véhicule contenant des produits agricoles, des denrées alimentaires, des vêtements, des jouets ou des cosmétiques qui pourraient être contaminés et devenir dangereux. Au cours du transport, il est impératif de respecter les réglementations nationales relatives au transport des pesticides et celles définies dans le document intitulé : Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses : Règlement type (Nations Unies, 2002).

2-2-3-5- L'épandage

L'épandage des pesticides nécessite que les opérateurs concernés soient expérimentés et connaissent bien le travail à faire pour que la technique d'épandage voulue soit utilisée efficacement et dans de bonnes conditions de sécurité. Pour cela il faut une formation à tous les niveaux, et tous les membres du personnel ayant des responsabilités d'encadrement ou de direction devront être soumis à un contrôle de connaissances sanctionné par un certificat d'aptitude qui permettra de s'assurer qu'ils en ont assimilé le contenu. L'opérateur doit faire en sorte que le produit soit épandu à l'endroit de façon homogène et au moment voulus, selon les règles et sous la surveillance d'un chef d'équipe qualifié. L'épandage doit se faire dans de bonnes conditions de sécurité en portant rigoureusement des vêtements protecteurs. Le matériel d'épandage devrait être convenablement entretenu (notamment en ce qui concerne l'étalonnage) et il devrait permettre d'épandre les produits en toute sécurité et efficacité, conformément aux bonnes pratiques de gestion définies par l'OMS (Najera et Zaim 2002).

2-2-3-6- L'élimination

L'utilisation des insecticides en santé publique et dans l'agriculture engendre divers types de déchets : restes de pesticides devenus obsolètes ou inutilisables pour une autre raison ; récipients et sachets de pesticides vides ; moustiquaires à imprégnation durable déchirées ou dont la date d'efficacité est dépassée ; matériel de protection personnel contaminé ; et équipement de vaporisation abandonné. Lors des opérations de pulvérisation, le matériel hors d'usage tels que les emballages et les récipients vides doivent être retirés de la réserve, décontaminés et démontés afin qu'ils ne soient pas utilisés à d'autres fins. Les solutions à pulvériser non utilisées, doivent être éliminées ainsi que les eaux de lavage, en veillant à éviter toute pollution de l'environnement. Les procédés d'élimination peuvent se faire par incinération ou hydrolyse avec des dispositifs appropriés. L'incinération est un processus d'oxydation thermique à haute température au cours duquel les molécules de pesticides sont décomposées en gaz et en solides imbrûlables. Pour réduire la pollution, l'incinérateur peut être équipé d'un dispositif d'épuration des gaz, comme un laveur de gaz et/ou des filtres électrostatiques. L'incinération conduite correctement peut, en principe, détruire les déchets de pesticides avec un taux de rendement d'élimination par destruction de 99,99 pour cent ou supérieur. Cependant l'efficacité de l'incinération dépend de nombreux facteurs, tels que: la conception; le contrôle du procédé et le maintien des valeurs appropriées de temps de rétention, de température et de turbulence; le type de produits incinérés; et la capacité et l'efficacité des équipements de dépollution de l'air.

L'hydrolyse est une méthode couramment utilisée; c'est la réaction d'une substance avec l'eau qui brise les liaisons de la molécule. L'hydrolyse en milieu basique, dans laquelle on ajoute une substance alcaline forte comme l'hydroxyde de sodium, la lessive ou la chaux, peut détruire les phosphates organiques et les carbamates, et réduire fortement leur activité biologique et les risques pour l'environnement.

Dans le cas de la PID dans l'Ouémé, ce sont les techniques d'élimination par hydrolyse et par incinération qui ont été retenues. La technique d'hydrolyse a été adoptée pour éliminer l'insecticide des outils de travail qui sont lavées avec de l'eau et du savon. Les eaux de lavage sont évacuées vers des fosses d'épuration de 1 m de profondeur, contenant du bas vers le haut des couches successives de sciure de bois, de charbon, de galets, du sable et de graviers. La technique d'incinération permet d'éliminer les matériaux solides comme les emballages, les gants, les cache-nez, les sacs et les futs d'insecticides. L'incinérateur de l'hôpital de Porto-Novo a été utilisé à cet effet.

2-2-3-7- Le suivi et la surveillance

Il est nécessaire aux unités de lutte antivectorielle de contrôler de façon régulière le comportement du produit sur les supports pulvérisés et la résistance des vecteurs aux pesticides et d'en rendre compte. Elles doivent également veiller à ce que les pesticides soient manipulés et épandus dans de bonnes conditions de sécurité. Si des dommages écologiques ou une réduction de l'efficacité sont constatés et signalés à temps, il est souvent possible de prendre des mesures correctives. L'exposition du personnel et des opérateurs doit être contrôlée par une équipe médicale spécialisée selon la périodicité et les méthodes recommandées par l'OMS. Le suivi des intoxications par des pesticides est capital et il est impérieux de prendre des mesures préventives et de se doter de moyens de diagnostic et de traitement des cas d'intoxications.

2-2-3-8- Renforcement des capacités et la mobilisation de la communauté

Le renforcement des capacités et la mobilisation de la communauté sont indispensables pour une bonne gestion des pesticides. Pour le renforcement des capacités, il faudra élaborer les outils législatif et réglementaire nécessaires, recruter et former du personnel en nombre suffisant, mettre à disposition les moyens techniques voulus et mettre en place l'infrastructure et, enfin, allouer des ressources suffisantes. La planification de l'action en matière de renforcement des capacités doit s'appuyer sur une analyse critique des ressources et de l'infrastructure existantes et s'inspirer des principes directeurs énoncés par la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) et l'OMS (OMS, 2003). Il est nécessaire d'élaborer des stratégies à long terme et des approches efficaces pour éduquer la population et toutes les parties prenantes, de manière qu'elles soutiennent les programmes de lutte antivectorielle et les activités pratiques de gestion des pesticides. Cette éducation doit permettre à la population de prendre conscience des enjeux, de les comprendre et d'adhérer pleinement aux activités de lutte au niveau local.

2-3- Les résistances du parasite aux médicaments et du vecteur aux insecticides

Selon l'OMS en 1957 "la résistance d'une souche (ou race) d'un insecte vis-à-vis d'un insecticide correspond au développement d'une capacité de tolérer des doses de toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus d'une population normale de la même espèce"

(OMS, 1957). Plus tard en 1985, Magnin *et al.*, ont défini les individus résistants comme des individus capables de survivre et de se reproduire malgré la présence dans leur environnement de composés toxiques pouvant tuer les individus dits " sensibles" .

2-3-1- La résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments

Les antifoliques et les antifoliniques sont, après la chloroquine, les antipaludiques les plus utilisés depuis 50 ans contre *P. falciparum*. Mais, ce parasite est devenu résistant à ces composés 1 an (antifolates) à 15 ans (chloroquine) après leur mise sur le marché (Le Bras, 1999). Depuis 30 ans environ, la chimiorésistance de l'agent du paludisme grave ne cesse de s'étendre en Afrique. Actuellement, le paludisme à *P. falciparum* polychimiorésistant est très répandu en Asie du Sud- Est et en Amérique du sud. Le continent africain, qui supporte la plus lourde charge de morbidité et de mortalité paludéennes, est également atteint (OMS, 2005). Cette résistance peut être croisée ou simultanée. La résistance simultanée est principalement la conséquence d'une utilisation simultanée importante de plusieurs antipaludiques induisant une forte pression sélective (Le Bras, 1999). Ainsi, en Asie du Sud-est, la résistance à la chloroquine s'est complétée d'une résistance à la pyriméthamine sulfadoxine à mesure que cette dernière relayait, à un coût similaire de traitement, la chloroquine. Mais l'intérêt mondial accordé à la lutte contre le paludisme a permis de mettre au point depuis une quinzaine d'années un nouveau groupe d'antipaludiques que sont les dérivés de l'artémisinine, en particulier l'artésunate, l'artéméthér et la dihydroartémisinine. Ces composés ont une action thérapeutique (baisse de la numération parasitaire et résolution des symptômes) très rapide, sont efficaces contre le paludisme à *P. falciparum* polychimiorésistant et sont bien tolérés par les malades (OMS, 2005). Aucune résistance du parasite aux dérivés de l'artémisinine n'a été observée à ce jour au Bénin, bien qu'une décroissance de sensibilité ait été détectée *in vitro* au Vietnam (OMS, 2005) et au Cambodge (Wongsrichanalai et Meshnick, 2008). Il faut toutefois noter que les dérivés de l'artémisinine sont très coûteux et ne sont donc pas accessibles aux populations. Leur achat nécessite souvent une aide financière extérieure (OMS, 2004).

2-3-2- La résistance de *Anopheles gambiae* aux insecticides

La lutte chimique contre *An. gambiae* s'est soldée par la sélection d'individus résistants. C'est après l'utilisation généralisée des organochlorés dans le domaine agricole et en santé publique

en Afrique que la résistance des principaux vecteurs (*An. gambiae* s.l. et de *An. funestus*) à ces produits, en particulier à la dieldrine, a été clairement établie (Coz *et al.*, 1968 ; Davidson, 1956; Davidson et Hamon, 1962 ; Self et Pant, 1966 ; Service, 1964 ; Service et Davidson, 1964). De plus, les pyréthrinoïdes et les organophosphorés sont largement utilisés aujourd’hui en agriculture, en santé publique et dans les ménages sous forme de serpentins et de bombes aérosols pulvérisées à l’intérieur des habitations humaines. Ce sont ces comportements des hommes, qui ont contribué à sélectionner chez les anophèles des mécanismes de résistance aux insecticides. Ces mécanismes sont très divers. Ils peuvent être comportementaux, physiologiques et biochimiques. Les mécanismes biochimiques sont les plus connus.

2-3-2-1- La résistance métabolique

Le premier cas de résistance de type métabolique fut décrit en 1950 avec la découverte du DDE (Dichlorodiphényldichloroéthylène), composé résiduel inoffensif fabriqué à partir de la métabolisation du DDT (Dichlorodiphényletrichloroéthane) (Perry et Hoskins, 1950). Elle consiste en une augmentation de l’activité enzymatique assurant la détoxication des insecticides. Les principales enzymes impliquées dans ces mécanismes de résistance sont les estérases, les oxydases à cytochrome P-450 et les glutathion-S-transférases (Oppenoorth, 1985). Les hydrolases ou estérases dégradent les groupements esters en alcools et en acides. Les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes de synthèse étant des esters, les monoxygénases induisent des réactions d’oxydation qui conduisent à la destruction des insecticides par la déstructuration de leurs molécules.

2-3-2-2- La modification de cible

Les principales cibles des pyréthrinoïdes, des organophosphorés et des carbamates sont les canaux ioniques ou enzymes intervenant dans la transmission de l’influx nerveux.

Les organophosphorés et les carbamates inhibent l’acétylcholinestérase responsable de l’hydrolyse de l’acétylcholine dans les synapses cholinergiques (Figure 5). La résistance à ces toxiques implique donc chez l’insecte une suppression ou une diminution de l’inhibition de l’acétylcholinestérase des synapses (Weill *et al.*, 2003), ce qui ne perturbe plus transmission de l’influx nerveux du moustique qui survit. La figure 5 illustre ce mécanisme en considérant l’exemple du bendiocarb. En 1964, Smissaert a été le premier à montrer l’existence de ce mécanisme chez l’acarien *Tetranychus urticae* dont la résistance au diazoxon est associée à

une modification de l'acétylcholinestérase. Aussi, le même mécanisme a été identifié chez de nombreux diptères, *Musca domestica* (Tripathi et O'Brien, 1973), *Anopheles albimanus* (Ayad et Georghiou, 1975), *Drosophila melanogaster* (Tobgy et al., 1976), *Culex pipiens* (Raymond et al., 1985). Il semble que la modification affecte la structure de l'enzyme de telle sorte que l'accès au site catalytique soit rendu plus difficile pour l'insecticide et parfois, mais d'une manière moindre, pour son substrat naturel, l'acétylcholine (Magnin et al, 1985).

Une autre cible est le canal sodium de la membrane nerveuse de l'insecte. Les insecticides organochlorés (DDT) et les pyréthrinoïdes perturbent les échanges ioniques au moment de la conduction de l'influx nerveux paralysant brutalement le moustique (Narahashi, 1983). Si la dose n'est pas mortelle, alors cette réaction de paralysie disparaît. Ce phénomène de paralysie est appelé « knock-down » et est provoqué par des doses graduelles d'insecticides chez les insectes sensibles et résistants (Farnham, 1973). Mais des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour le canal sodium diminuent son affinité entre l'insecticide et son site de fixation (Pauron et al 1989). Au Bénin, Chandre (1998), Akogbéto et al, (1999) ont aussi observé ce mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. gambiae*. Ce mécanisme est responsable d'une résistance croisée avec le DDT. Inversement la sélection au DDT induit une résistance croisée à ce composé et aux pyréthrinoïdes (Priester et Georghiou, 1980 ; Orner et al., 1980).

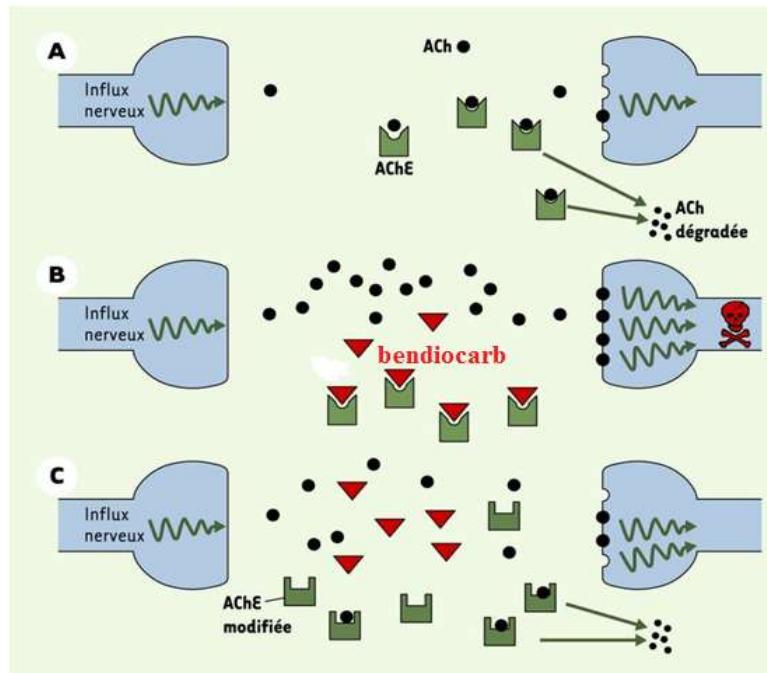


Figure 5: Rôle de l'acétylcholinestérase1 (*ace-1*) dans la transmission synaptique.(Weill, 2003, modifié)

A. Situation d'un moustique sensible sans bendiocarb. L'*ace-1* dégrade l'excès d'acétylcholine dans la synapse. **B.** Situation d'un moustique sensible en présence du bendiocarb. Les insecticides inhibent l'*ace-1* qui ne dégrade plus suffisamment l'acétylcholine, ce qui conduit à un prolongement toxique de l'influx nerveux. **C.** Situation d'un moustique résistant en présence du bendiocarb. Le bendiocarb n'inhibe plus l'*ace-1^R*. En revanche, l'acétylcholine est moins bien dégradée par l'enzyme mutée que par l'enzyme sauvage, ce qui conduit à une transmission du signal non optimal.

2-3-3- Gestion de la résistance

Un suivi régulier de la résistance des moustiques aux insecticides permet de conserver leur efficacité pour contrôler les populations des vecteurs et de nuisibles. Pour y arriver, il est nécessaire de disposer d'outils moléculaires et biochimiques permettant la détection précoce des mécanismes de résistance dans les populations de vecteurs et, d'autre part, de connaître les facteurs intrinsèques et extrinsèques capables d'influencer la dynamique de ce phénomène sur le terrain. Celle-ci est liée à des facteurs biologiques, génétiques et opérationnels (Georghiou et Taylor, 1977; Georghiou 1980). Les facteurs biologiques concernent directement le cycle de vie de l'insecte cible et son écologie, alors que les facteurs génétiques intéressent les propriétés des gènes de résistance. D'autres facteurs dits opérationnels sont liés aux qualités du traitement et des produits utilisés. Toute stratégie de gestion de la résistance doit obéir à ces facteurs. Les modes de gestion de la résistance peuvent se faire par modération en maintenant la population sensible, par saturation en augmentant les doses d'insecticides à utiliser, ou par l'utilisation de combinaisons d'insecticides. En santé publique, les cas concrets de gestion raisonnée de la résistance sont rares (Pennetier, 2005). Le cas le plus intéressant est celui du programme OCP (Onchocerciasis Control Program) en Afrique de l'Ouest, dans lequel une rotation systématique d'insecticides chimiques et biologiques a permis de bloquer l'évolution de la résistance aux organophosphorés chez les larves de simulies (Kurtak 1990; Hougard *et al.*, 1993).

Nous exposons dans la suite la méthodologie suivie pour atteindre nos objectifs et renvoyons aux annexes pour les détails de nos protocoles.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1-Evaluation en cases expérimentales de l'efficacité de quelques insecticides pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamate en pulvérisation intradomiciliaire

1-1-Présentation de la station d'étude

La station expérimentale qui a servi à l'exécution de l'étude a été construite par le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) à Akron (figure 6), à la périphérie de Porto-Novo, capitale du Bénin. Porto-Novo est une ville située à 6°33 de latitude nord et 2°37 de longitude est au sud du Bénin, à une dizaine de kilomètres de l'océan Atlantique. Akron est situé en bordure de la lagune de Porto-Novo, dans une zone marécageuse entretenue pour la culture des légumes. Les espaces situés autour des parcelles de légumes de cette zone maraîchère sont de véritables gîtes de *An. gambiae* qui est le principal vecteur du paludisme. Cette espèce est permanemment présente sur le site et a développé une forte résistance aux pyréthrinoïdes ; le principal mécanisme de cette résistance est la mutation *kdr* avec une fréquence supérieure à 0,8 (Yadouleton *et al.*, 2010). L'étude à réaliser exige la présence de six cases expérimentales ou « cases- pièges » (figure 7). Cinq cases seront traitées aux insecticides et une case non traitée servira de témoin. Le concept de case-piège a été élaboré dans les années 1950 afin d'étudier le comportement des moustiques à l'intérieur des maisons, mais aussi pour l'évaluation de l'impact du DDT en PID (Coz, 1965). Construites dans les villages et au sein des communautés, les cases expérimentales permettent d'avoir une image presque réelle de l'efficacité de l'outil de lutte. L'appellation « cases -pièges » est liée au fait que leur conception permet une entrée des moustiques par les chicanes mais la sortie est quasi impossible. La seule sortie ou entrée possible pour les moustiques ayant pénétré dans les cases, est une véranda piége (figure 8) sur le côté opposé à celui de la porte. Chaque case a une longueur de 2,50m et une largeur de 1,75m pour une hauteur au plafond de 2m. Les murs sont faits de parpaings enduits de ciment, le sol de ciment et le toit de tôle ondulée. Une bâche en plastique est tendue sous le toit pour protéger de la chaleur et faciliter la capture des moustiques. Chaque case est entourée d'une rigole pleine d'eau pour empêcher l'entrée des fourmis et des araignées, grandes consommatrices de moustiques.

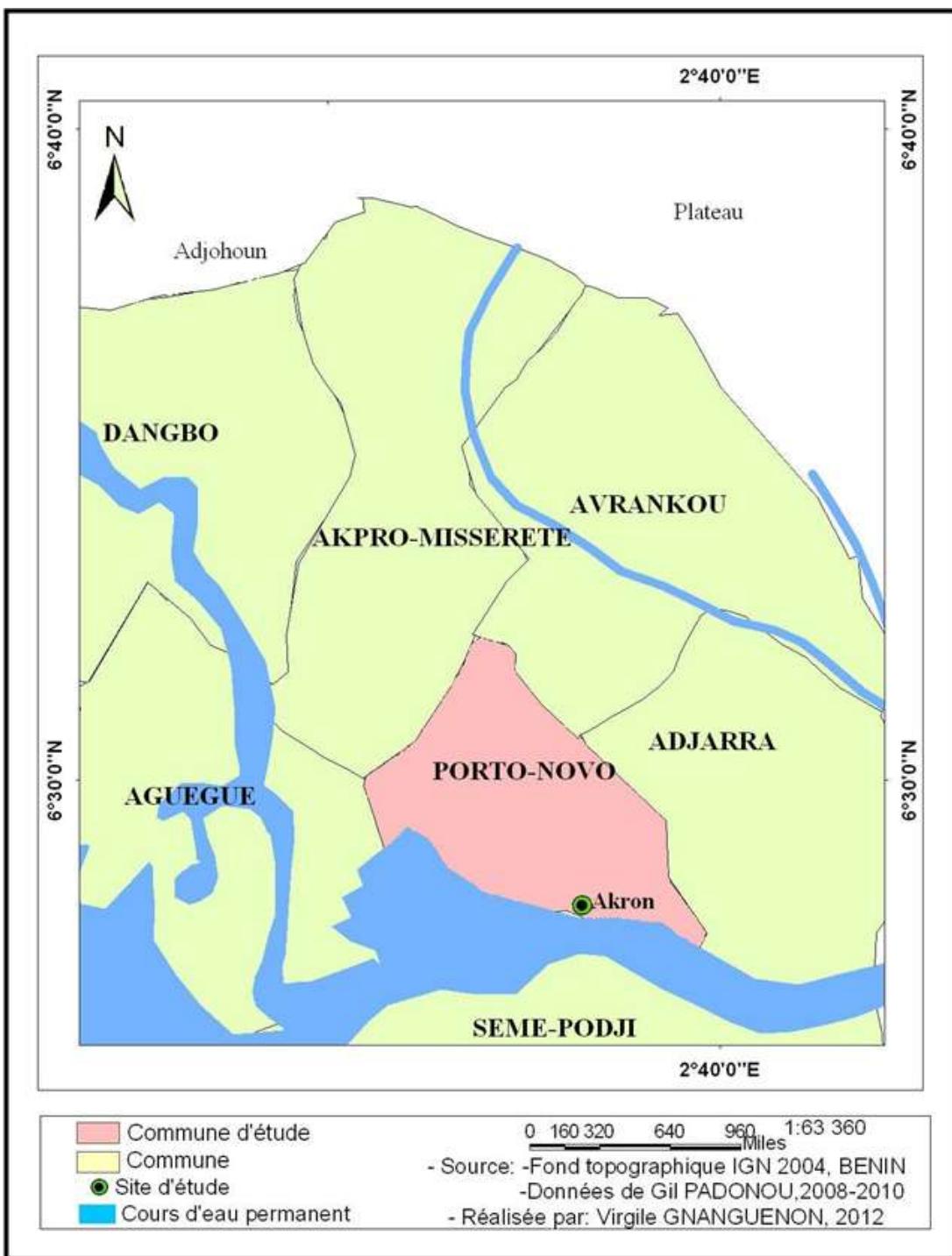


Figure 6 : Carte de localisation de Akron



Figure 7 : Cases expérimentales construites à Akron

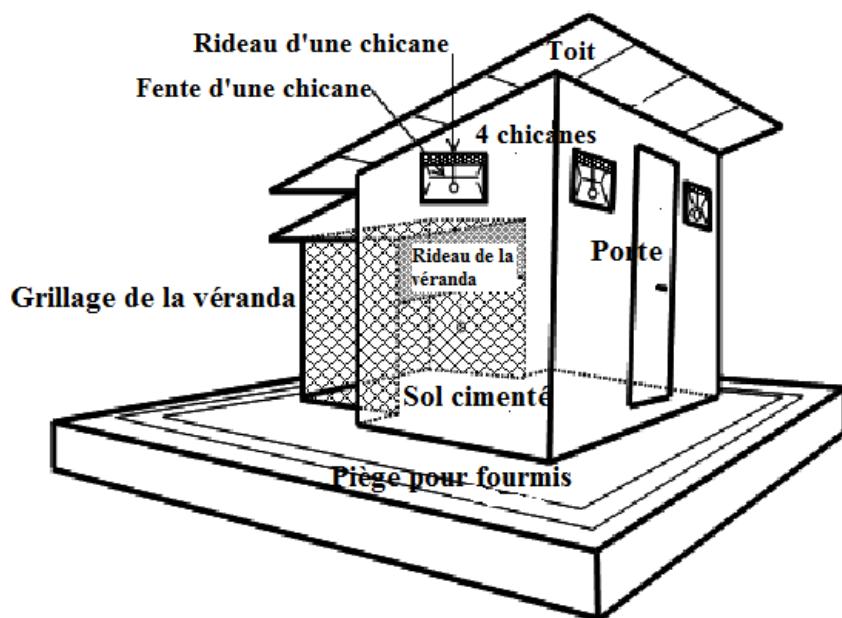


Figure 8 : Détails et description d'une case- piège (WHO, 2006).

1-2- Evaluation de l'attractivité des cases pour les moustiques : captures au temps zéro (To)

Au début de l'évaluation, nous avons organisé deux semaines de captures de nuit à l'intérieur des cases-pièges pour apprécier l'attractivité de chaque case et vérifier si cette attractivité pour le moustique est la même ou si certaines cases sont plus attractives que d'autres. Pour capturer les moustiques, le principe a consisté à faire dormir de jeunes adultes volontaires autochtones d'Akron dans les cases-pièges, sous moustiquaires non imprégnées. Ces volontaires ont été recrutés parmi les habitants d'Akron et des quartiers environnants et dorment dans les cases de 21 heures à 6 heures. Au total, nous avons utilisé six captureurs-dormeurs, un captureur par case. Ceux-ci capturent, dès le réveil à 6 heures du matin, tous les moustiques qui sont entrés dans les cases la nuit, à l'aide d'un aspirateur à gobelet. Pour éviter une éventuelle influence des captureurs sur l'attractivité des cases pour les moustiques, une rotation des captureurs est assurée chaque nuit.

1-3- Traitement des cases

Le traitement insecticide des cases a été fait à l'aide d'un pulvérisateur à dos. Après avoir déterminé le volume d'absorption de la solution insecticide par mètre carré du support à pulvériser, le volume total V de solution insecticide à préparer est calculé par mesure des dimensions des surfaces à pulvériser dans la case. Ensuite la quantité totale du produit insecticide à pulvériser est mesurée puis versée dans le réservoir du pulvérisateur. Cette quantité est complétée par de l'eau de puits ou de robinet jusqu'au volume V de solution insecticide à pulvériser. Ensuite le réservoir est hermétiquement fermé, puis vigoureusement agité pendant au moins 30 secondes afin de bien mélanger l'insecticide et l'eau. Chaque insecticide à étudier est attribué par tirage au sort à l'une des cases pour la durée de l'étude. La capacité de rétention des murs par case a été déterminée et a été de 112mL/m^2 , celle du toit (en polyéthylène), des chicanes et de la porte (en métal revêtu de peinture) a été de $53,13\text{ mL/m}^2$. La surface des murs à traiter est de 15m^2 et celle du plafond, de la porte et des chicanes à traiter est de $5,097\text{ m}^2$. Pour l'imprégnation des murs d'une case, nous avons alors prélevé 1,7L d'eau et pour les portes, les chicanes et le toit, 270,82 mL d'eau.

La case 1 a été traitée au bendiocarb à 200 mg/m^2 selon le dosage recommandé par l'OMS ($0,1\text{ g/m}^2$ à $0,4\text{ g/m}^2$) (Najera et Zaim, (2004)). Nous avons utilisé une formulation qui est une

poudre mouillable contenant 80% de matière active (WP 80 FICAM). Le bendiocarb étant à 800g/kg la quantité q_1 (Pleass et al ., 1993) qu'il faut utiliser pour les 15 m^2 est :

$$\frac{200 \times 15 \times 1000}{800} = 3750 \text{ mg. Cette quantité a été mesurée avec une balance puis diluée dans}$$

$V=1,7 \text{ L}$ d'eau pour traiter les murs de la case 1. Le même procédé est suivi pour calculer la quantité q_2 de bendiocarb qu'il faut utiliser pour les $5,097 \text{ m}^2$ soit :

$$\frac{200 \times 5,097 \times 1000}{800} = 1274,25 \text{ mg. Cette quantité a été mesurée avec une balance puis diluée}$$

dans $V=270,82 \text{ mL}$ d'eau pour traiter les supports du plafond, de la porte et des chicanes.

Selon le dosage recommandé par l'OMS (Najera et Zaim, 2004) et en appliquant le même mode de calcul, nous avons obtenu pour chacune des autres cases les quantités suivantes :

- La case 2 : à $0,025 \text{ g/m}^2$ avec la deltaméthrine 250g/kg ($0,020 \text{ g/m}^2$ à $0,025 \text{ g/m}^2$) soient $q_1 = 1,5 \text{ g}$ et $q_2 = 0,51 \text{ g}$.
- La case 3 : à $0,03 \text{ g/m}^2$ avec l'alpha-cyperméthrine 50g/kg ($0,020 \text{ g/m}^2$ à $0,03 \text{ g/m}^2$) soient $q_1 = 9 \text{ g}$ et $q_2 = 3,05 \text{ g}$.
- La case 4 : à 2 g/m^2 avec du fénitrothion 400g/kg (2 g/m^2) soient $q_1 = 75 \text{ g}$ et $q_2 = 25,48 \text{ g}$.

La case 5 a été traitée avec une formulation liquide du mélange chlorpyriphos 250g/l + deltaméthrine 12g/l dont il faut prélever 200mL pour préparer 10L de solution à pulvériser correspondant à une dose de $0,025 \text{ g/m}^2$ de deltaméthrine (normes OMS) et une dose de $0,56 \text{ g/m}^2$ de chlorpyriphos (à titre expérimental). Cela correspond à 2,24 mL de mélange Chlorpyriphos 250g/l + Deltaméthrine 12g/l à diluer dans 112 mL - 2,24 mL = 109,76 mL d'eau pour 1 m^2 donc $q_1 = 34 \text{ mL}$ de mélange à diluer dans $V=1700 \text{ mL} - 34 \text{ mL} = 1666 \text{ mL}$ d'eau et $q_2 = 5,41 \text{ mL}$ de mélange à diluer dans $V=270,82 \text{ mL} - 5,41 \text{ mL} = 265,41 \text{ mL}$ d'eau.

1-4- Captures après traitement des cases à l'insecticide

Les captures ont démarré 72 heures après le traitement des cases pour éviter des intoxications des captureurs. Chaque matin, à 6 heures, le volontaire baisse le rideau séparant la pièce centrale de la véranda pour empêcher les moustiques de changer de compartiment sous l'effet de l'insecticide. A 8 heures, tous les moustiques sont récoltés dans chaque case. Leur localisation (case ou véranda) et leur état physiologique (mort, vivant, gorgé ou non) sont

enregistrés. Les moustiques vivants sont maintenus en survie (nourris avec du jus sucré) pour mesurer la mortalité 24 heures après leur exposition au traitement.

1-5- Les lâchers-recapture

En raison de la faible densité d'anophèles au cours de l'étude, nous avons procédé, par mois et à partir de 20 heures, à des lâchers dans les cases expérimentales, d'un nombre de 60 à 80 femelles de *An. gambiae* à un stade physiologique précis de leur développement. Trois répliques de lâchers sont effectuées par mois pour chaque case. Au total 1920 *An. gambiae* sont lâchés pour les six cases et 1420 sont capturés soit un pourcentage de 73,96%. Il s'agit en l'occurrence de femelles n'ayant encore jamais pris de repas de sang et âgées de 5 jours. Ce sont des *An. gambiae* dont les larves ont été prélevées à Akron autour de la station expérimentale et élevée sur place. Les lâchers se font 15 minutes avant l'entrée des volontaires dans les cases (temps d'acclimatation).

1-6- Paramètres étudiés

Au cours de l'étude quatre indicateurs entomologiques sont utilisés pour évaluer l'impact des insecticides sur les moustiques :

-L'effet dissuasif

C'est la réduction du taux d'entrée ou taux de réduction, qui est obtenu en faisant la différence : nombre de *An. gambiae* des cases témoins (N témoin) moins nombre de *An. gambiae* des cases traitées (N traité) multiplié par 100 divisé par le nombre de *An. gambiae* des cases témoins soit :

$$\text{Taux de réduction} = (N \text{ témoin} - N \text{ traitée}) \times 100/N \text{ témoin}$$

-L'exophilie

Elle est déterminée par le rapport : nombre de *An. gambiae* qui sortent de la case pour se réfugier dans la véranda piège (N véranda) multiplié par 100 divisé par le nombre total de *An. gambiae* des cases (N case). Pour les cases traitées, on détermine l'exophilie induite et pour les cases témoins l'exophilie naturelle. L'on peut écrire :

$$\text{Exophilie} = (N \text{ véranda}) \times 100/N \text{ case}$$

-Le taux de gorgement

Ce taux est obtenu en faisant le rapport : Nombre de *An gambiae* gorgés (N gorgés) multiplié par 100, divisé par le total de *An gambiae* capturés (N total). Ce qui permet de comparer les taux de gorgement de la case témoin avec celles des cases traitées :

$$\text{Taux de gorgement} = (\text{N gorgés}) \times 100 / \text{N total}$$

-L'effet létal

C'est l'action létale due à l'insecticide. Trois paramètres ont été évalués : la mortalité immédiate : c'est le nombre de *An gambiae* récoltés morts (N morts) multiplié par 100, divisé par le nombre total (N total) de *An gambiae* ; la mortalité différée c'est le nombre de *An gambiae* morts après 24 heures (N morts retardés) multiplié par 100, divisé par le nombre total (N total) de *An gambiae* ; la mortalité générale est la somme de la mortalité immédiate et de la mortalité différée.

$$\text{Mortalité immédiate} = (\text{N mortes}) \times 100 / \text{N total}$$

$$\text{Mortalité différée} = (\text{N morts retardés}) \times 100 / \text{N total}$$

Mortalité Totale : Mortalité immédiate + Mortalité différée

-Si la mortalité chez le témoin est comprise entre 5% et 20%, la mortalité dans la case traitée est corrigée selon la formule d'Abott :

$$\text{Mortalité totale corrigée} = (E - C) \times 100 / (100 - C)$$

E : mortalité dans la case traitée ; C : mortalité dans la case témoin.

1-7- Informations sur les effets secondaires des insecticides utilisés

Les insecticides utilisés pourraient en cas d'intoxication chez l'homme, avoir des effets toxiques pour le système nerveux, central et/ou périphérique : inhibition des cholinestérases pour les organophosphorés et les carbamates, action sur le canal sodique pour les pyréthrinoïdes de synthèse. Pour cette raison des collectes de données qualitatives ont été réalisées par des entretiens individuels pour recueillir les avis des dormeurs –captureurs sur les effets des traitements des cases dès le premier mois et à la fin des captures au quatrième mois (voir la structure du guide d'entretien en annexe).

2-Evaluations à l'échelle communautaire

2-1-Présentation de la zone d'étude

La zone d'étude est située dans le département de l'Ouémé et comprend 4 communes : Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè-Kpodji (figure 9) couvrant une superficie de 977 km². Le total de la population est de 310400 habitants (INSAE, 2004) pour 64799 ménages dont 62890 enfants de 0 à 5 ans répartis dans 174 villages (INSAE, 2004). C'est une population très variée constituée d'agriculteurs et de commerçants. La plus importante frange sont les Ouémènou essentiellement à Dangbo et Adjohoun. La deuxième frange est constituée des Torinou à Missérété et des Xwla à Sèmè. Ces populations pratiquent, dans l'ensemble du département de l'Ouémé, le catholicisme (37,1%), le christianisme céleste (12,3%) et l'islam (12,1%) et l'animisme (38,5%) (Institut National de Statistique et d'Analyse Economique, 2004).

Au plan sanitaire, l'incidence du paludisme (grave et simple) est de 143,8 % dans le département de l'Ouémé qui occupe la deuxième place dans le pays après le département du Littoral (Ministère de la Santé de la république du Bénin, 2007). Par ailleurs, de 2002 à 2006, le département de l'Ouémé fut l'un des plus touchés par la mortalité due au paludisme: 1,43% en 2006 et 3,68% en 2004. En 2003 et 2005 les taux de mortalité étaient similaires 2,12% puis 2,81% (Ministère de la Santé de la république du Bénin, 2007). A Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè, le nombre de cas de paludisme a été respectivement de 9264, 13505, 8864 et 23971 au cours de l'année 2007. Le taux de couverture en infrastructures sanitaires est de 75% pour la commune de Adjohoun et de 100% pour les 3 autres communes (Ministère de la Santé de la république du Bénin, 2007). Le taux de fréquentation des formations sanitaires est respectivement de 32%, 41%, 20%, et 40% à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè (Ministère de la Santé de la république du Bénin, 2007).

Au plan écologique, les 4 communes sont caractérisées par un climat de type subéquatorial et présentent deux types d'environnement: la zone du plateau et celle de la vallée en bordure du fleuve Ouémé et de la lagune de Porto-Novo.

Le plateau est caractérisé par un sol en terre de barre, un mélange assez homogène d'argile kaolinitique et de sable quartzeux. La végétation est essentiellement anthropique constituée d'arbustes, de palmiers à huile et de graminées avec quelques reliques forestières par endroits. Le relief est assez accidenté et sous forme de pente orientée vers les dépressions marécageuses. Cette situation est très accentuée à Adjohoun, Dangbo et Missérété où

l'érosion du sol creuse de nombreux trous, lieux de rétentions d'eaux temporaires durant les saisons pluvieuses. Cela constitue pour les moustiques des gîtes favorables.

Le deuxième type d'environnement est la dépression du fleuve Ouémé à Adjohoun et Dangbo et de la lagune de Porto-Novo à Sèmè. La dépression de Sèmè est une plaine sableuse sans relief, couverte par une forêt mésophile très dégradée et des plantations de cocotiers. La nappe phréatique y est très peu profonde et affleure le sol, comme à Cotonou (Akogbéto, 1992). Cette absence de relief, associée à un mauvais drainage des eaux, provoque des inondations à la saison pluvieuse et favorise la multiplication des gîtes de *An. gambiae*. En bordure de la lagune, Sèmè est marqué par la présence d'une plantation de mangrove à *Rhizophora racemosa* qui pourrait servir de lieu de repos à *An. melas*. En effet, les gîtes de moustiques issus de la lagune de Porto-Novo, une étendue d'eau légèrement saumâtre, seraient favorables au développement des larves de cette espèce (Coluzzi et al., 1979 ; Akogbéto et Di Deco, 1995 ; Akogbéto et Romano, 1999). La dépression d'Adjohoun et Dangbo encore appelée la vallée de l'Ouémé est constituée de sols marécageux entretenus pour la culture des légumes. L'aménagement des terres en périmètre maraîcher, crée de véritables gîtes de *An. gambiae* principal vecteur du paludisme fortement résistant aux pyréthrinoïdes (Padonou, 2008). A Dangbo et Adjohoun, la nature argileuse des sols et la nappe phréatique peu profonde, permettent, en saison pluvieuse, la rétention d'eau en surface. Cela a pour conséquence le développement de nombreuses flaques d'eau qui sont des gîtes favorables à la reproduction rapide de *An. gambiae*. De plus, le régime climatique soudanien caractéristique de la région centrale du pays soumet le fleuve Ouémé et la lagune de Porto-Novo à un régime de crues et de décrues qui influence la dynamique de la population culicidienne et le profil épidémiologique du paludisme. Pendant la crue, la plupart des gîtes de *An. gambiae* sont lessivés. A la décrue, le retrait des eaux crée de petites poches d'eau çà et là, favorables au développement de *An. gambiae*.

Dans le contexte actuel de la promotion généralisée de l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide, il n'est pas facile de trouver un bon contrôle. Toutefois, nous avons choisi une région périphérique et une région centrale de la ville de Porto-Novo (figure 9) qui présente les mêmes caractéristiques écologiques et géographiques, comme les 4 communes mentionnées ci-dessus. Dans chaque commune, nous avons choisi 4 quartiers ou villages qui ont servi de sites de capture: 2 dans la zone périphérique marécageuse inondable et 2 sur le plateau (figure 9).

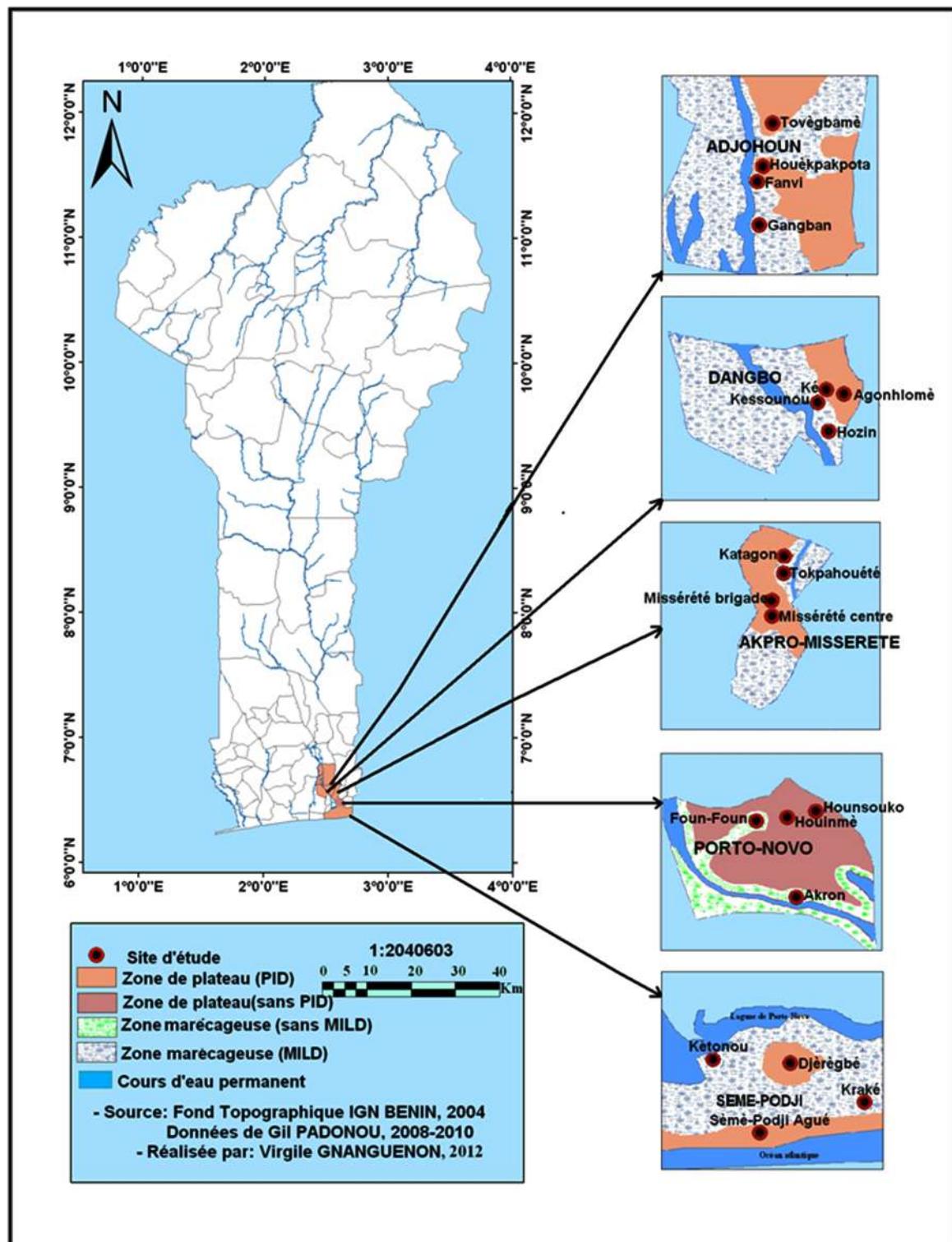


Figure 9 : Carte de la zone d'étude montrant les communes sélectionnées

2-2-Volet sociologique

2-2-1- Collecte des données

Il s'agit d'une étude transversale, descriptive et analytique basée sur un questionnaire quantitatif et qualitatif. Le questionnaire quantitatif a été administré par des intervieweurs qualifiés à 3228 personnes, en particulier aux hommes et femmes chefs de ménages après leur consentement. Le contenu du questionnaire (voir annexe) a porté sur le niveau d'instruction des enquêtés, leurs connaissances, attitudes et pratiques relatives à la nuisance des moustiques (piqûres, maladies), aux moyens utilisés pour se protéger contre les moustiques (moustiquaires, spirales, pulvérisations intradomiciliaires) et au traitement du paludisme (médecine traditionnelle, médecine moderne). Des observations directes sur le terrain nous ont permis de noter les types d'habitats rencontrés dans le milieu (maisons en ciment ou en banco) et la surface des murs (lisses, rugueux). Les sujets qui ne pouvaient pas lire ou écrire ou comprendre la langue française ont communiqué en langue locale. L'unité statistique a été le chef de ménage. Outre les informations individuelles recueillies grâce au questionnaire, un focus groupe (Krueger, 1994) impliquant les leaders d'opinion (taille de 10) a été réalisé dans chaque village afin de mieux comprendre les attitudes des gens, leur compréhension et leur perception des moustiquaires et de la PID.

2-2- 2- Echantillonnage

Selon les caractéristiques écologiques et les données sociologiques liées à la prévention et à la gestion du paludisme de la zone d'étude, une dizaine de villages représentatifs ont été sélectionnés dans chaque commune. La taille de l'échantillon a été déterminée en utilisant la formule proposée par Wayne (2005):

$$N = t^2 \times p(1 - p)/M^2$$

N = taille d'échantillon requise

t = niveau de confiance à 95% (valeur type de 1,96)

p = prévalence estimative du paludisme dans la zone

m = marge d'erreur à 5% (valeur type de 0,05)

A cause de l'absence de données statistiques fiables sur la prévalence du paludisme, p a été estimée à 50% (Wayne, 2005; Seck *et al*, 2008 ; Albouy-latty, 2009) pour chaque commune.

Par conséquent la taille de l'échantillon équivaut à $N = 384$. Une marge d'erreur $m = 384 \times 5/100$ a été ajouté à N pour corriger les imprévus tels que la non-réponse due aux erreurs d'enregistrement. Ensuite la valeur corrigée de la taille a été multipliée par 2 afin de réduire l'effet de grappe (Seck et al., 2008). Cela donne la valeur définitive de $N = 807$ personnes à interroger par commune.

2-3-Volet entomologique

L'évaluation sur les données entomologiques de base n'a duré que 7 mois de janvier à juillet 2008. Nous n'avons pas pu faire l'enquête de base au-delà de juillet parce que le PNLP devait démarrer la mise en œuvre de la PID nécessairement à cette période en raison des engagements pris avec le partenaire financier. Par ailleurs, tout le dispositif de la PID était déjà en place y compris l'équipe de RTI (Research Triangle International) chargée de l'exécution du programme. Toutefois, malgré la brièveté de l'enquête (7 mois), les travaux ont porté sur les 2 saisons caractéristiques de l'année : la saison sèche (janvier-mars) et la saison pluvieuse (avril-juillet). Afin de mesurer l'impact réel de la PID sur la transmission, nous avons comparé les valeurs des taux d'inoculation entomologique indiquées pour les mêmes périodes (Janvier-Juillet 2008) avant PID et celles de Janvier-Juillet 2009, après la PID. Nous avons exclu Août-Décembre 2008 et 2009 de l'analyse. Pour ces 2 périodes d'intervention les données de base ne sont pas disponibles pour faire des comparaisons. Pour évaluer l'impact sur le comportement du vecteur, les paramètres entomologiques mesurés portent sur le degré d'endophagie induite par la présence du bendiocarb sur les murs et des moustiquaires imprégnées, la réduction du taux d'entrée des *An. gambiae* dans les maisons sous interventions, le taux de gorgement, la gravidité, le taux d'endophilie et l'effet létal dû aux insecticides. Ces paramètres sont mesurés avant la mise en place des interventions de janvier 2008 à juillet 2008, puis de septembre 2008 à février 2009 après la mise en place des premières interventions et d'avril 2009 à septembre 2009 après la mise en place des deuxièmes interventions. Des prospections sur le terrain nous ont permis de récolter des larves dont l'élevage nous a fourni des adultes de *An. gambiae*, pour l'étude de la sensibilité aux insecticides.

2-3-1-Echantillonnage des moustiques

-Capture de nuit sur des volontaires autochtones

Dans chaque commune, dans les villages sélectionnés les points de capture ont été choisis de façon raisonnée selon la disponibilité des habitants à participer à l'étude. La récolte des moustiques a été réalisée à l'aide d'aspirateur à bouche individuel. Dans chaque commune nous avons utilisé 4 habitations humaines pour les captures à raison de 2 captureurs par habitation, soit 8 captureurs par commune. Les cases ont été sélectionnées en fonction du nombre de personnes qui y dorment. Dans les cases que nous avons choisies, il y a eu un seul habitant par case. Les captures ont lieu à l'intérieur et à l'extérieur (figure 10) des habitations de 21 h à 5 h, au rythme de deux jours consécutifs par mois. Les moustiques capturés ont été identifiés et comptés selon l'espèce et le lieu de capture. Une rotation des captureurs sur les points de captures a été réalisée au cours des nuits successives de capture afin de minimiser les biais d'échantillonnage.



Figure 10 : Capture des moustiques sur homme

-Capture par piège-fenêtres et par aspersion de bombe aérosol

Un total de 40 pièges fenêtres a été posé pour les 5 communes dont le témoin, à raison de 2 pièges fenêtres par maison. Le piège fenêtre (figure 11) est constitué d'un tulle de térylène

montée sur un cadre en fer de forme cubique, mesurant 30 cm d'arrête. L'entrée des moustiques est facilitée par un trou de 2,5 cm de diamètre fixé au sommet d'un cône tronqué qui est placé à 25 cm de la face opposée du piège. Le piège est fixé sur un contre plaque (figure 11) de 1m² de surface selon les dimensions de la fenêtre. Une ouverture de 30 cm de côté est faite au centre du contre-plaqué pour pouvoir placer le piège. Le piège est posé devant la fenêtre du côté extérieur de la chambre à coucher. Les chambres choisies sont celles occupées par une seule personne. Ces chambres n'ont pas d'autres ouvertures en dehors des portes et fenêtres. Deux séances de capture aux pièges fenêtres ont été organisées par mois de 18h au lendemain à 06h30 pour récolter les moustiques exophiles. Lesdits moustiques ont servi à l'identification de l'espèce, à la détermination de l'état physiologique de l'abdomen, à la recherche du taux d'infection et à la caractérisation moléculaire. Après la récolte des moustiques exophiles, une aspersion intradomiciliaire avec une bombe insecticide non rémanant a permis de récupérer la fraction de la faune résiduelle endophile pour déterminer le degré d'endophilie des anophèles.



Figure 11: Collecte des moustiques dans un piège-fenêtre

-Récolte des larves d'anophèles

Dans chaque commune les larves et les nymphes ont été collectées dans les gîtes de reproduction (figure 12) près des habitations humaines, où les conditions de repas de sang sont disponibles pour les anophèles. La plupart des gîtes prospectées sont les petites flaques

d'eau de pluie, empreintes de pas, caniveaux, fossés, rives, étangs, bassins, marécages, puits et citernes. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau avec la louche selon la méthode de trempage (O'Malley, 1995). Le contenu est versé dans un récipient qui est rempli progressivement. On laisse décanter, puis on filtre avec un tamis en forme d'entonnoir pour recueillir les larves dans des boîtes étiquetées en fonction de chaque localité. Les larves sont élevées dans des conditions standard de température (26 à 30°C) et d'humidité (70 à 80 %) à l'insectarium (figure 13) du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) pour obtenir des anophèles adultes.



Figure 12: Gîtes et collecte des larves dans une flaue d'eau pluviale



Figure 13 : Dispositif montrant l'emplacement des larves élevées à l'insectarium du CREC

2-3-2- Identification et traitement des anophèles vecteurs.

Les moustiques collectés après chaque séance de capture ont été identifiés (figure 14) au niveau de l'espèce à l'aide de la clé de détermination morphologique (Gillies, 1968). Le nombre de moustiques par espèce, l'état physiologique de l'abdomen des femelles à jeun, gorgés, semi gravides et gravides ont été enregistrés sur une fiche de collecte de données. Un échantillon de chaque spécimen de *An. gambiae* et *An. funestus* a été disséqué sur une lame dans une goutte d'eau distillée et la lecture du taux de parturité a été déterminée selon la technique de Detinova (1963) basée sur l'aspect des trachéoles des ovaires. Les anophèles à trachéoles déroulées ont été considérés comme des pares, et ceux à trachéoles enroulés comme des nullipares. Ensuite, la femelle disséquée est coupée en 2 parties : la tête – thorax mise dans un microtube étiqueté et destinée à la détermination de l'indice sporozoïtique par la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Wirtz *et al.* , 1987), puis la carcasse constituée par le reste de l'abdomen, les ailes et les pattes du moustique disséqué est mise dans un autre microtube étiqueté et a servi à la détermination de l'espèce, de la forme moléculaire (M ou S) et de la recherche du gène de résistance (*kdr* et/ou *ace-1^R*) par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) (Voir protocoles détaillés des examens ELISA et PCR en annexe) . La conservation des différentes parties du moustique dans les microtubes a été faite dans des tubes Eppendorf 1,5 ml contenant du silicagel et rangés dans des cryoboites dans un congélateur à -20°C.

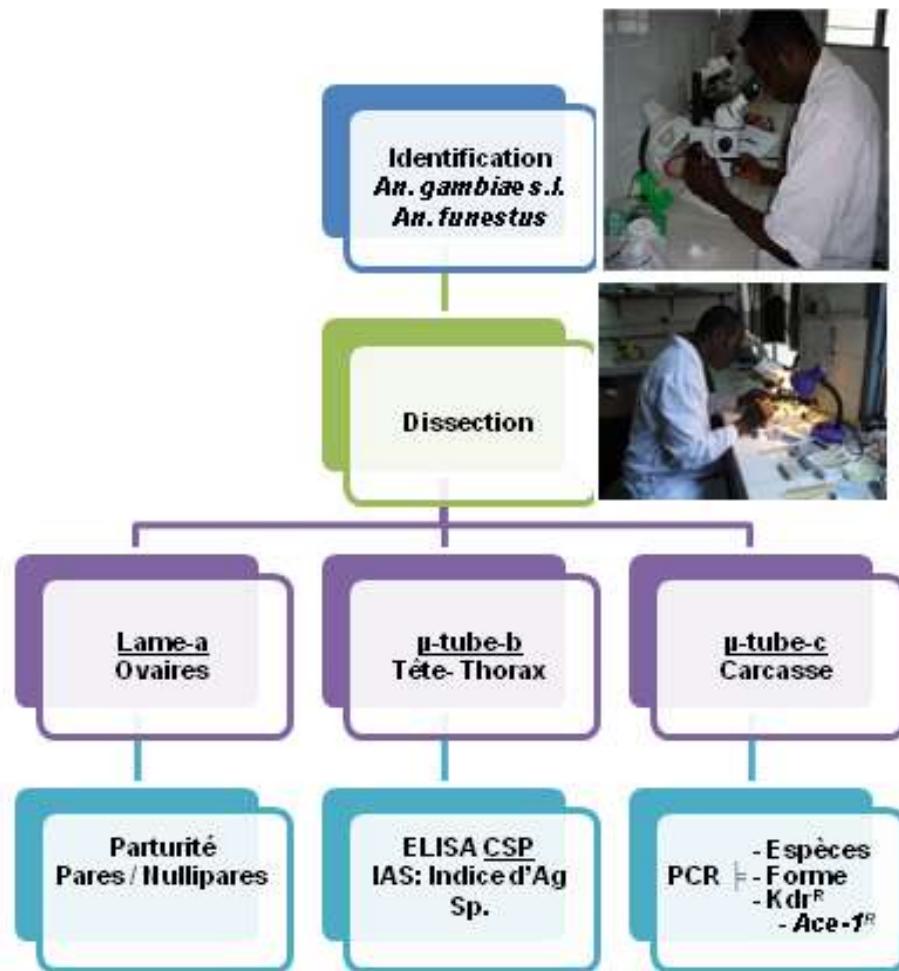


Figure 14: Diagramme montrant le processus d’identification et de traitement des anophèles vecteurs

2-3-3- Test de sensibilité aux insecticides.

Les femelles adultes à jeun, élevées à l’insectarium, âgées de 2 à 5 jours ont été soumises aux épreuves de sensibilité aux insecticides selon le protocole OMS (OMS, 1998). Pour cela, les papiers imprégnés de DDT, de la perméthrine, de la deltaméthrine et du bendiocarb aux doses diagnostiques respectives de : 4% ; 0,75% ; 0,05% ; 1%, ont été utilisés. Pour chaque insecticide, 4 lots de 25 moustiques ont été exposés pendant 1heure à chaque insecticide dans les tubes en cylindre de type OMS (figure 15). L’accent a été mis sur la deltaméthrine, en raison de la distribution des moustiquaires de type Permanet 2.0 dans les zones inondables. L’utilisation du DDT est justifiée par la détection de la résistance croisée entre les pyréthrinoïdes et les organochlorés dans les populations d’anophèles (Chandre *et al.*, 1999). Le bendiocarb (carbamate) est l’insecticide choisi pour la pulvérisation intradomiciliaire dans

les zones non inondables. Pour chaque commune, cinq tubes cylindriques OMS ont été utilisés et contiennent chacun un papier non traité ayant servi de contrôle ou un papier imprégné pour l'exposition des moustiques. Un effectif moyen de vingt-cinq moustiques ont été introduits dans chaque tube. Au cours du test, le nombre de moustiques tombés sous le choc de l'insecticide (effet kd) au bout de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutes d'exposition a été enregistré. Après l'exposition, les moustiques ont été mis en observation avec un accès libre au jus sucré de solution glucosée 10%. Les mortalités ont été enregistrées après 24 heures et le statut de résistance de la population a été déterminé selon le protocole recommandé par l'OMS (WHO, 1998). Les tests n'ont été validés que lorsque la mortalité observée dans les témoins à été inférieure à 5%. Les moustiques morts et survivants de cet essai biologique ont été séparément conservés à -20 ° C pour les tests de PCR.

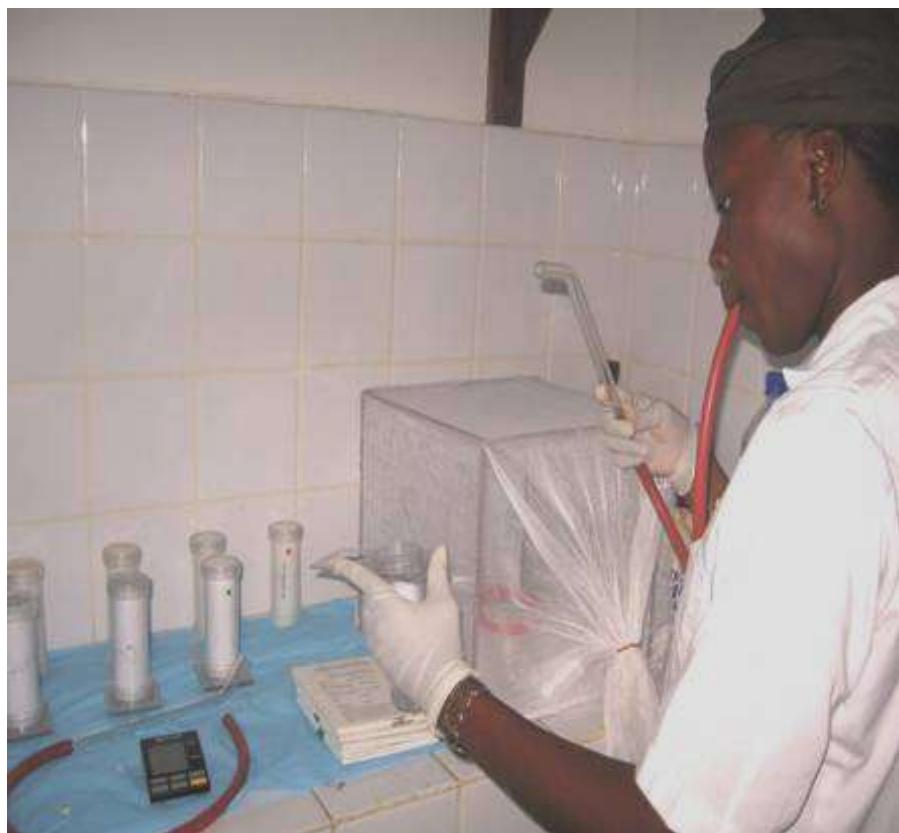


Figure 15: Réalisation du test en cylindre OMS

2-3-4- Le traitement des murs

L'insecticide qui a été utilisé pour traiter les murs est le bendiocarb sous forme de poudre mouillable contenant 80% de matière active. Un sachet de 125g de formulation a été mélangé à 10 litres d'eau et a servi à traiter 250 m² de mur afin d'obtenir un dépôt de 400 mg de matière active par m². Les traitements ont été réalisés durant 4 rounds en début de saison pluvieuse au cours des mois d'Août 2008, Mars 2009, Avril et Août 2010 respectivement pour le premier, deuxième, troisième et quatrième round. Plus de 90% des lieux de couchages ont été traités à chaque round (Research Triangle Institute, 2010). Le traitement a été réalisé selon les recommandations de l'OMS par des opérateurs qui ont fait usage d'un pulvérisateur manuel haute pression HUDSON XPERT.

2-3-5- Réalisation des tests d'efficacité du bendiocarb appliqué sur les murs.

Dans les 4 communes, nous avons identifié les différents types de supports traités au bendiocarb. Selon les habitudes de construction des populations (Padonou *et al*, 2011), 5 types de supports ont été en majorité traités : le mur en terre de barre (banco), le mur en brique de ciment mélangé à du sable, du mur en terre de barre crépi avec de la bouse de vache, les portes métalliques et les portes en bois. Pour étudier l'efficacité et la rémanence du bendiocarb sur ces supports, des tests entomologiques en cône basés sur la technique standard de l'OMS (2006) ont été réalisés. A cet effet, deux types de femelles de *An. gambiae* âgés de 2 à 5 jours ont été utilisées. La population sauvage de *An. gambiae* issue d'un élevage de larves et de nymphes récoltées sur le terrain et la souche sensible de référence (Kisumu). La population sauvage a été utilisée pour évaluer l'efficacité du bendiocarb dans les conditions de terrain et la souche sensible pour suivre la rémanence du bendiocarb selon les recommandations de l'OMS (2006). Les moustiques ont été maintenus en contact avec le support traité, grâce à un cône transparent de type CDC. Pour cela, 15 moustiques de chacun des 2 types (sauvage et sensible) ont été prélevés à l'aide d'un aspirateur à bouche et introduits dans le cône fixé au mur (figure 16). Trois cônes ont été utilisés pour chaque support et fixés à des hauteurs différentes (haut, milieu et bas). Après 30 minutes de contact avec le support traité (figure 17) les moustiques ont été délicatement transférés dans des gobelets voilés sur lesquels sont posés des tampons de coton imbibés de solution glucosée à 10% (figure 18). La lecture de la mortalité a été faite après 24 heures de mise en observation. Les taux de mortalité ont été déterminés et notés pour chaque type de moustique en fonction

du type de support traité. Les bioessais sur les supports traités ont été réalisés en fonction du temps T_0 , T_1 , T_2 , T_3 et T_4 , défini comme suit :

- T_0 : 0 à 30 jours après la date de pulvérisation ;
- T_1 : 31 à 60 jours après la date de pulvérisation ;
- T_2 : 61 à 90 jours après la date de pulvérisation ;
- T_3 : 91 à 120 jours après la date de pulvérisation ;
- T_4 : 121 à 150 jours après la date de pulvérisation.

L'intervalle de temps entre les bioessais de chaque période a été de 1 mois.

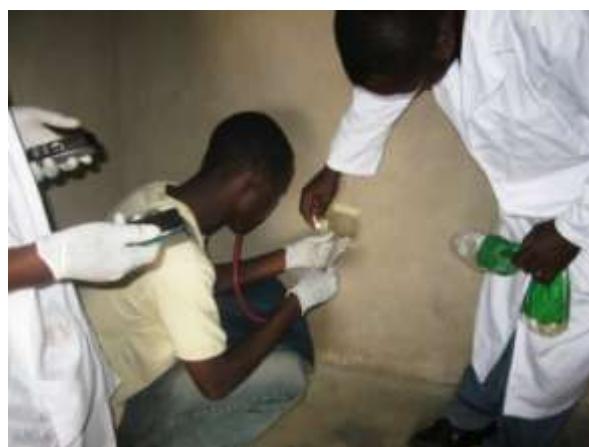


Figure 16 : Introduction des *An. gambiae* dans le cône fixé au mur.



Figure 17 : Contact des *An. gambiae* avec le support traité



Figure 18 : Conservation des *An. gambiae* en observation durant 24h après exposition au bendiocarb sur les différents supports traités.

2-3-6-Vérification du concept de "long lasting" (longue durée d'action) attribué aux moustiquaires Permanet 2.0

En septembre 2008 et en mai 2009 des moustiquaires Permanet 2.0 ont été distribuées dans les communes d'Adjohoun et de Dangbo par le Programme National de Lutte Contre le Paludisme (PNLP). Des tests ont été effectués sur des moustiquaires collectées dans 690 ménages choisies au hasard: 200 à Adjohoun et 490 à Dangbo selon la méthode de Anderson (1993). Dans chaque ménage les moustiquaires ont été échantillonnées selon les critères ci-après:

- Moustiquaire de type Permanet 2.0 de PMI
- Année de distribution : 2008, 2009
- Moustiquaire régulièrement utilisée (tous les jours)
- Nombre de mois d'utilisation à partir du jour de son installation au lieu de couchage

Ces critères nous ont permis de collecter 1380 moustiquaires que nous avons regroupées selon l'année de distribution (2008, 2009) (Tableau III). Ces deux catégories de moustiquaires ont été réparties par lot selon la durée d'utilisation. Par exemple lot n pour les moustiquaires qui ont n mois comme temps d'utilisation. Des tests en cône ont été ensuite réalisés sur chacune des moustiquaires identifiées (figure 19). Ce test a pour but d'étudier le comportement de deux populations de moustiques (*An. gambiae* Kisumu, souche sensible de référence et *An. gambiae* sauvage récoltée dans la zone d'étude) vis-à-vis des MIILDs. Pour ce fait, quatre cônes sont placés sur les diverses faces de chaque MIILD à tester. Pour chaque population, 5 à 8 jeunes femelles de *An. gambiae s.l.* âgées de 2 à 5 jours ont été introduites dans chaque cône. Les moustiques ont été mis en contact de la moustiquaire pendant 3 minutes puis ont été retirés des cônes et transférés dans un gobelet stérile voilé sur lequel est posé du coton imbibé du jus glucosé à 10%. Après 24h de mise en observation, les taux de mortalités ont été déterminés pour chaque population de moustiques par rapport aux diverses moustiquaires testées. Des tests témoins ont été réalisés avec des moustiquaires non imprégnées. Les tests n'ont été validés que lorsque la mortalité observée dans les témoins a été inférieure à 5%.

Tableau III : Nombre de moustiquaires collectées en fonction de la durée d'utilisation

	Durée d'utilisation (Mois)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre de moustiquaires de 2008 collectées	9	17	26	113	209	295	35	43	26
Nombre de moustiquaires de 2009 collectées	173	156	156	122	0	0	0	0	0
Total	182	173	182	235	209	295	35	43	26



Figure 19: Réalisation des tests en cône sur les moustiquaires.

2-3-7- Approbation éthique

Cette étude a reçu l'approbation du Ministère de la Santé et du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). Les volontaires captureurs ont donné leur consentement avant de participer à l'étude. Par ailleurs, ils ont été soumis à un suivi médical régulier avec des traitements préventifs du paludisme.

2-3-8- Les paramètres mesurés

Ils portent sur la densité des vecteurs, la réduction du taux d'entrée, le taux d'agressivité de *An.gambiae* par homme et par nuit, le taux d'endophilie naturelle, le taux de gorgement, le taux de mortalité, le taux d'endophagie, le taux de parturité, le taux d'inoculation entomologique et la sensibilité aux insecticides.

-Le taux d'agressivité est le rapport du nombre total de moustiques capturés sur le nombre de nuit de capture et le nombre de captureurs.

-Le taux d'endophagie a été calculé en faisant le rapport du nombre de moustiques capturés sur homme à l'intérieur des cases sur le total des moustiques dénombrés à l'intérieur et à l'extérieur par capture sur homme.

-Le taux de gorgement a été calculé en divisant le nombre de moustiques gorgés capturés dans les pièges-fenêtres et ceux tombés morts après aspersion de bombe aérosol à l'intérieur des maisons sur le nombre total de moustiques capturés.

-Le taux d'endophilie a été calculé en faisant le rapport du nombre de moustiques capturés à l'intérieur (faune endophile) par aspersion de bombe sur le total des moustiques capturés dans les pièges-fenêtres (faune exophile) et par aspersion de bombe.

-Le taux de gravidité a été calculé en faisant le rapport du nombre de moustiques gravides capturés à l'intérieur (faune endophile) par aspersion de bombe et dans les pièges-fenêtres (faune exophile) sur le total des moustiques capturés.

-Le taux de parturité a été calculé en faisant le rapport du nombre de femelles pares sur le total des moustiques femelles pares et nullipares.

-La sensibilité des moustiques aux insecticides a été définie selon l'OMS (OMS, 1998). La population est dite sensible lorsque, le taux de mortalité des moustiques testés est $\geq 98\%$. Lorsque la mortalité est $< 98\%$ et $\geq 80\%$ la population a été soupçonnée de résistante. Enfin nous avons considéré comme population résistante, tout moustique pour lequel le taux de mortalité des populations testées est $< 80\%$.

-Le taux d'inoculation entomologique est défini selon la formule de Mac Donald (1956), comme le produit de l'indice sporozoïtique par le nombre de piqûres reçues par homme pendant un temps donné.

-La réduction du taux d'entrée des *An. gambiae* dans les maisons sous interventions a été calculée en faisant la différence entre le nombre de moustiques capturés dans les chambres à pièges-fenêtres avant intervention et celui après intervention.

-Le taux de mortalité a été calculé en divisant le nombre total de moustiques capturés morts par le total récolté.

2-4- Volet Clinique

Sur le plan clinique, une enquête rétrospective basée sur le recueil des données des formations sanitaires des quatre communes d'intervention nous a permis de comparer l'incidence du paludisme en 2007 (dernière année avant les interventions PID et MIILDS) avec celle de 2010 (2 années après les interventions PID et MIILDS). Notre thèse n'a pas pour but d'étudier l'impact clinique de la PID et des MIILDS. Mais pour avoir une vue globale de la situation du paludisme avant la PID, nous avons complété les données entomologiques par les paramètres cliniques tels que enregistrés dans les formations sanitaires. Il s'agit d'une étude rétrospective sur les cas de paludisme notifiés dans les populations autochtones par les responsables des formations sanitaires. Ces formations sanitaires sont les centres de santé tenus par des infirmiers ou des médecins qui consignent les nombres de cas d'accès palustres dans leurs registres suivant des critères définis par le Système National d'Information et de Gestion Sanitaires (SNIGS). Ces données sont ensuite analysées par les statisticiens du Service des Etudes, de la Planification et du Suivi (SEPS) de la Direction Départementale de la Santé de l'Ouémé et du Plateau (DDS-OP). Les cas de paludisme sont rapportés pour les classes d'âge des "moins de 5 ans" et des "5 ans et plus". Les paramètres ci-après sont recueillis à partir des registres de ces formations sanitaires:

- la population couverte par les formations sanitaires (population cible) ;
- les variables de morbidité : nombre de cas de paludisme simple (paludisme présumé), nombre d'accès palustres graves présumés (dans les centres avec hospitalisation où travaillent des médecins).

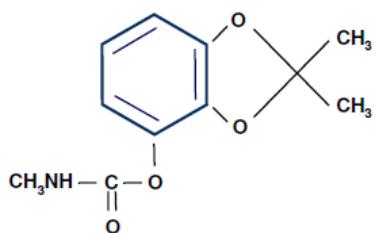
L'incidence du paludisme a été déterminée selon les critères du SNIGS : nombre de nouveaux cas de paludisme en une année divisé par la population cible (MS, 2007).

Les structures sanitaires prospectées sont l'hôpital de zone de Adjohoun, tous les centres de santé publics d'arrondissement et de communes puis les cliniques privées officiellement autorisées par le Ministère de la Santé pour fournir les prestations sanitaires aux populations.

3- Mise en place des interventions

3-1-La pulvérisation intradomiciliaire

Le bendiocarb est l'insecticide qui a été sélectionné pour réaliser la pulvérisation intradomiciliaire. Encore appelée 2,2-Diméthyl-1,3-benzodioxol-4-yl, le bendiocarb a pour structure chimique :



C'est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui est une enzyme intervenant dans la régulation de l'influx nerveux. Son mode d'action se fait par contact et ingestion. La pulvérisation du bendiocarb a été réalisée sur les murs des lieux de couchage dans les localités non inondables des communes de Adjohoun, Dangbo, Missérétré et Sèmè. En effet, dans une étude récente réalisée au Bénin (Akogbéto *et al.*, 2010), cet insecticide s'est montré particulièrement efficace en cases expérimentales sur les vecteurs du paludisme. Le bendiocarb est sans odeur et ne tâche pas. La formulation utilisée est le Ficam WP sous forme de sachets (figure 20) hydrosolubles de poudre mouillable hautement concentrée (80%). Nous avons appliqué sur les murs 0,4g/m² de bendiocarb. Cette application a été réalisée par des agents d'hygiène qui ont été formés à cet effet (figure 21). Le taux de couverture de la pulvérisation des maisons est de 94% en août 2008 et de 99% en mars 2009. Pour le traitement des murs, les applicateurs ont utilisé un pulvérisateur manuel à pression préalable du type HUDSON XPERT (figure 22). Au cours de la pulvérisation plusieurs mesures de sécurité sont prises. Les agents pulvérisateurs (figure 23) sont rigoureusement soumis au port d'équipements de protection individuelle constitués de blouse, bottes, masques et gants. Les populations bénéficiaires sont sensibilisées par les autorités locales et les agents de santé sur les dispositions à prendre pour éviter tout contact du produit durant et après les opérations de pulvérisation de leurs cases.



Figure 20 : Emballage de la formulation de bendiocarb utilisée



Figure 21: Agents d'hygiène en cours de formation
(Research Triangle Institute, 2009)



Figure 22 : Pulvériseurs manuels à pression préalable du type HUDSON XPERT



Figure 23 : Applicateurs en tenue prêts pour la pulvérisation (Research Triangle Institute, 2009)

3-2-La distribution des moustiquaires

Elle a ciblé les ménages des zones humides inondables des communes de Dangbo, Adjohoun et Sèmè. La distribution a été faite par le PNLP en collaboration avec certaines femmes des groupements féminins locaux des communes bénéficiaires. Ces femmes ont circulé en pirogues ou à pied pour poser les MILDs dans chaque ménage (figure 24). Les moustiquaires qui ont été posées sont de type PermaNet 2.0 de forme rectangulaire de 150 cm de hauteur, 180 cm de longueur et de 160 cm de largeur. Les fibres sont en polyéthylène et imprégnées de deltaméthrine à 55 mg/m². Ces moustiquaires ne nécessitent pas de réimprégnation pendant toute la durée d'utilisation de 4 à 5 ans en général. Elles ont été distribuées avec un taux de couverture de 88,3% lors de la 1^{ère} distribution en août-septembre 2008 et à 99% lors de la 2^{ème} distribution en mai 2009.



Figure 24: Moustiquaire posée dans un ménage (Research Triangle Institute, 2009)

4-Analyse statistique

Les données obtenues pour l'étude sociologique ont été contrôlées puis enregistrées en utilisant la version du logiciel Microsoft Office Excel 2007 de Windows. Le calcul des fréquences des variables étudiées a été réalisé à l'aide du logiciel SPSS (Version 16.0). La version 2.11.1 du logiciel R a été utilisée pour effectuer le test du chi-carré afin de comparer la proportion de chacune des variables liées à chaque région. Pour les variables de type binaire, le même logiciel R a été utilisée pour effectuer une régression logistique mixte multivariée afin de tester l'association entre la connaissance de l'IRS avec les trois covariables (sex, niveau d'éducation, et les pratiques médicales) d'une part, et l'association entre l'acceptation de l'IRS avec ces 3 covariables d'autre part.

L'analyse statistique de paramètres de l'évaluation en cases expérimentales a été effectuée en utilisant le logiciel SPSS v16.0. L'efficacité des traitements est appréciée par une analyse de variance (ANOVA) des paramètres en y incluant le test de Dunnet, afin de comparer chacun des traitements au témoin.

Pour l'étude à l'échelle communautaire, durant la période de pré-intervention la normalité des paramètres étudiés a été testée par le test de Shapiro-Wilk et nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis pour comparer les paramètres : densité, endophagie et agressivité entre les localités, entre les zones écologiques et entre les saisons. L'ANOVA a été utilisée pour l'analyse des moyennes de l'endophilie, de la gravidité et de la parturité. La comparaison de la fréquence kdr entre les localités a été réalisée avec le logiciel Genepop en utilisant le test exact de Fisher.

L'efficacité de l'intervention a été évaluée en utilisant le test de Kruskal-Wallis pour comparer les paramètres (taux de gorgement, taux de gravidité, taux d'endophilie) entre les périodes avant et après intervention. Le test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les taux de mortalité entre ces deux périodes. Par ailleurs, les différents paramètres (TIE et parturité) ont été calculés pour la même période avant (Janvier –Juillet 2008) et après (Janvier –Juillet 2009) interventions. En utilisant le logiciel SPSS Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL), les calculs des moyennes du nombre de piqûres par homme et par nuit (P/H/N) et leurs intervalles de confiance à 95% (IC) ont été réalisés. Ensuite le calcul du pourcentage de réduction des moyennes du nombre de piqûres par homme et par nuit (P/H/N) et du Taux d'Inoculation Entomologique (TIE) a été effectué. Le test de Chi² a permis de comparer les taux de parturité durant les périodes avant et après intervention. Le logiciel R version 2.11.1 (R Development Core Team, 2010) a permis d'effectuer une régression logistique, une analyse de la déviance

et un test de Walds pour évaluer la significativité de l'incidence du paludisme de 2010 par rapport à 2007.

Pour la période de post-intervention, en utilisant le logiciel R version 2.11.1 (R Development Core Team, 2010), une régression logistique univariée, a été réalisée avec la fréquence *kdr* comme variable dépendante et l'année en tant que covariable. Un ANOVA a permis de déterminer l'association de la fréquence *kdr* (variable dépendante) d'une part avec les localités et aussi avec les années 2007, 2009 et 2010 (covariables) d'autre part. Cette régression a également été utilisée pour apprécier la fréquence *kdr* dans les zones d'intervention par rapport aux zones de contrôle. Il fut de même pour tester l'association entre les taux de mortalité (variable dépendante) aux insecticides et les localités (covariables). Le test de Wald a été utilisé pour comparer le taux des fréquences *kdr* et de mortalité dans les zones d'intervention avec les zones de contrôle. Pour comparer la fréquence *ace-1^R* entre les zones d'intervention et les zones de contrôle nous avons utilisé le test exact de Fisher (logiciel Genepop) (Raymond et Rousset, 1995) parce que le gène a été rarement observé chez les moustiques testés. Ce même test a été utilisé avec le test du chi carré pour la comparaison des fréquences *kdr* et *ace-1* d'une année à l'autre. Le test de corrélation de Kendall a été utilisé pour étudier la corrélation entre les taux de mortalité et de survivants à la deltaméthrine, avec la fréquence *kdr*. De plus, des tests de comparaison de proportion ont été faits afin d'étudier les variations de l'efficacité du bendiocarb en fonction du temps et des différentes parties (haut, milieu, bas) des différents supports traités. Le temps au bout duquel 80% des moustiques exposés aux différents supports traités sont susceptibles de mourir a été déterminé pour chaque support au cours des 4 tours de PID grâce à un modèle probit de régression avec le logiciel SPSS Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Le niveau de signification a été fixé à 5%.

**Chapitre 3 : Evaluation en cases expérimentales de
l'efficacité de quelques insecticides
pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamate
en pulvérisation intradomiciliaire**

1-Introduction

Les vecteurs majeurs du paludisme ont très rapidement développé la résistance aux insecticides au cours de la dernière décennie (Ranson et al., 2011) à travers toute l'Afrique. Cette rapide évolution de la résistance a suscité plusieurs interrogations et représente une menace pour l'efficacité des programmes de lutte antivectorielle basés sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées (Sharp et al., 2007; N'Guessan et al., 2007). Par conséquent, il urge de développer de nouvelles alternatives de lutte pour limiter l'expansion de la résistance chez *An. gambiae*. Dans ce contexte de forte résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Bénin a souhaité entreprendre, en 2008 un vaste programme de lutte anti-vectorielle basée sur la pulvérisation intradomiciliaire (PID). Il s'est posé le problème du choix de l'insecticide à utiliser pour le traitement des maisons, étant donné la forte résistance développée par *An. gambiae* vis-à-vis des pyréthrinoïdes.

Le principal objectif de ce chapitre est de vérifier si des insecticides non pyréthrinoïdes tels que les carbamates (bendiocarb) et les organophosphorés (fénitrothion) peuvent avoir un impact sur les anophèles résistants aux pyréthrinoïdes et peuvent être utilisés comme alternatives en pulvérisation intradomiciliaire contre les piqûres de moustiques. L'impact mesuré a reposé sur plusieurs paramètres : le taux de gorgement des moustiques en contact des supports traités, l'exophilie induite par les produits utilisés et leur effet létal.

Les études réalisées dans cette partie de la thèse ont été publiées en détail dans l'article 1 en annexe, mais nous reprenons ici les points essentiels relatifs aux résultats et à la discussion.

Article 1 : Akogbeto M, Padonou G G, Gbenou D ,Irish S ,Yadouleton A :Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malaria Journal* 2010, **9**:204.

2-Résultats

2-1- Attractivité des cases-pièges pour les moustiques

Parmi les moustiques capturés les culicinés ont été plus nombreux que le principal vecteur du paludisme *An. gambiae*. Les cases 2 et 5 ont été les moins attractives, alors que les cases 3 et 6 ont été les plus attractives pour l'ensemble des moustiques (figure 25). L'homogénéité de

cette attractivité a été vérifiée par une analyse de variance (ANOVA) des nombres de moustiques capturés dans chaque case. Cette analyse a montré que le facteur case n'a pas influencé significativement le nombre des moustiques qui entrent ($p=0,228$ pour *An. gambiae* et $p = 0,257$ pour les culicinés).

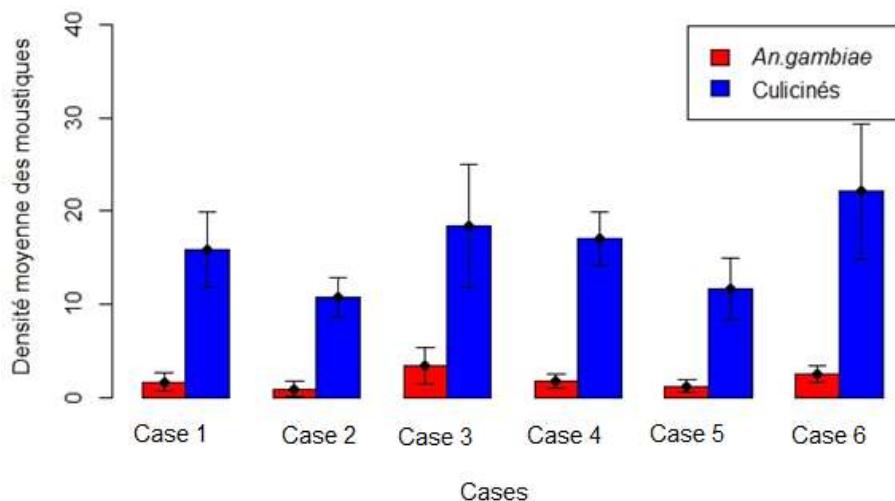


Figure 25 : Densités moyennes de *An. gambiae* et de Culicinés dans les cases pièges du 5 au 15 septembre 2007 avant le traitement des cases à l'insecticide.

2-2- Résultats des captures après traitement des cases à l'insecticide

Ces résultats sont consignés dans les tableaux IV, V et VI.

2-2-1-Réduction du taux d'entrée et d'exophilie induite

Au premier mois de l'évaluation la réduction du taux d'entrée des anophèles (tableau IV) et des culicinés (tableau V) a été plus significative pour la deltaméthrine et l'alpha-cyperméthrine que pour le bendiocarb. Pour le fénitrothion et le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine elle a été nulle sur *An. gambiae* et respectivement 17,43% et 12,82% pour les culicinés. Au deuxième mois nous avons noté une réduction des *An. gambiae* de 30,69% dans la case traitée au mélange chlorpyriphos + deltaméthrine, de 24,75% dans celle traitée à la deltaméthrine et de 5,94% dans celle traitée au fénitrothion.

La deltamétrine et l'alpha-cyperméthrine ont induit une exophilie significativement élevée ($p < 0,05$) sur les *An. gambiae* librement entrés (tableau IV) ou lâchés (tableau VI) dans les cases, contrairement au bendiocarb, au fénitrothion et au mélange chlorpyriphos + deltaméthrine dont l'exophilie induite n'est significative que sur les *An. gambiae* lâchés ($p > 0,05$ pour l'entrée libre et $p < 0,05$ pour les lâchers). Aux troisième et quatrième mois ces taux, ont été respectivement de 51,38% et 63,04% ($p < 0,05$) pour le bendiocarb, 42,30% et 55,88% ($p > 0,05$) pour l'alpha-cyperméthrine puis 35,82% et 57,14% ($p > 0,05$) pour le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine.

2-2-2- Impact sur le taux de gorgement

Au cours du premier mois la deltaméthrine, l'alpha-cyperméthrine et le bendiocarb n'ont pas réduit de façon significative le taux de gorgement ($p > 0,05$) des *An. gambiae* librement entrés (tableau IV) dans les cases contrairement au fénitrothion et au mélange chlorpyriphos + deltaméthrine ($p < 0,05$). Mais pour les *An. gambiae* lâchés (tableau VI) dans les cases et les culicinés librement entrés (tableau V), le taux de gorgement a été réduit de façon significative pour les cinq insecticides ($p < 0,05$). Au cours des troisième et quatrième mois, c'est encore le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine ($p < 0,05$) et le fénitrothion ($p < 0,05$) qui ont réduit le taux de gorgement respectivement à 4,47% et 3,7 % au troisième mois puis à 2,04 % et 4,44 % au quatrième mois.

2-2-3-Impact sur la mortalité

2-2-3-1- Impact sur le taux de mortalité immédiate

Aux premier et deuxième mois, la deltaméthrine et l'alpha-cyperméthrine ont induit une mortalité immédiate significative. En revanche au deuxième mois, seul l'alpha-cyperméthrine a exercé une mortalité significativement élevée (39,02 %) comparativement à la deltaméthrine (tableaux IV, V et VI). Au premier mois le bendiocarb a exercé une action létale immédiate significativement supérieure à celles de la deltaméthrine et de l'alpha-cyperméthrine, mais relativement inférieure à celle du mélange chlorpyriphos + deltaméthrine et du fénitrothion. Cette action du bendiocarb s'est poursuivie au deuxième mois, mais a été inférieure à celles du fénitrothion (74,40 % pour les *An. gambiae* lâchés dans les cases) et du mélange

chlorpyriphos + deltaméthrine (44,28% pour les *An. gambiae* librement entrés dans les cases). Ces performances sont poursuivies au cours des troisième et quatrième mois.

2-2-4-2- Impact sur le taux de mortalité totale

Au cours du premier mois la deltamétrine et l'alpha-cyperméthrine ont exercé une mortalité générale significative sur les *An. gambiae* librement entrés (tableau IV) ou lâchés (tableau VI) dans les cases et sur les culicinés (tableau V). Par contre, le bendiocarb a fait preuve d'une action létale plus importante de l'ordre de 92,85% sur les anophèles librement entrés. Le même effet a été noté avec le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine et avec le fénitrothion, mais à un degré inférieur sur les culicinés et à un taux de l'ordre de 100% sur les anophèles librement entrés. Au deuxième mois, la deltamétrine et l'alpha-cyperméthrine ont provoqué une mortalité générale significative équivalente (31,57 % et 39,32%) sur les anophèles librement entrés dans les cases, mais plus faible que celles des autres insecticides dont le fénitrothion qui s'est avéré plus efficace avec un taux de 83,72 %. Cette efficacité est maintenue jusqu'au troisième mois avec des taux de 77,77 %, 90,74%, 88,05 % respectivement pour le bendiocarb, le fénitrothion et le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine. Au quatrième mois, tous les 5 insecticides, ont exercé une mortalité générale significative ($p <0,05$) mais avec des taux significativement différentes les unes des autres. C'est la deltaméthrine qui a eu le taux le plus bas (28,12%) et le fénitrothion le taux le plus élevé (77,77 %).

Tableau IV : Données entomologiques relatives à l'impact des traitements sur *An.gambiae* enregistrées au cours des deux premiers mois après le traitement des cases (entrée libre des anophèles).

Cases	Mois	Effectif des femelles capturées	Réduction du taux d'entrée (%)	Exophilie (%)	Taux des femelles gorgées (%)	Taux de mortalité immédiate (%)	Taux de mortalité générale (%)
Témoin	1	80	-	12,5 ^a	31,25 ^a	0 ^a	3,7 ^a
	2	101	-	19,80 ^a	29,70 ^a	0 ^a	2,97 ^a
Bend	1	70	12,5	28,6 ^a [14,49-42,30]	20 ^a [12,13-31,85]	57,14 ^c [48,65-69,86]	92,85 ^c [85,76-99,65]
	2	80	20,79	22,50 ^a [09,80-28,85]	12,50 ^b [03,05-19,05]	25 ^{bc} [10,93-41,82]	68,75 ^c [56,42-81,80]
Delta	1	55	31,25	45,4 ^b [25,31-74,95]	18,18 ^a [06,28-33,91]	32,72 ^b [18,40-51,46]	72,72 ^b [58,79-84,06]
	2	76	24,75	26,31 ^a [15,86-37,36]	23,68 ^a [07,04-50,63]	15,78 ^b [06,81-29,32]	31,57 ^b [22,81-40,33]
α-Cyper	1	61	23,8	42,6 ^b [24,62-61,36]	19,67 ^a [06,65-33,45]	27,86 ^b [16,29-44,95]	77,04 ^b [59,85-95,52]
	2	89	11,88	22,47 ^a [15,18-31,77]	13,48 ^a [06,88-21,50]	19,10 ^b [10,98-29,85]	39,32 ^b [34,33-44,32]
Féni	1	85	0	24,7 ^a [13,16-39,70]	9,41 ^b [03,03-17,35]	91,76 ^d [84,30-96,87]	100 ^c [100-100]
	2	95	5,94	22,10 ^a [14,20-28,93]	12,63 ^b [04,14-20,38]	40 ^{cd} [30,73-52,55]	73,68 ^c [64,41-82,95]
Chlor-	1	85	0	17,6 ^a [08,95-25,94]	10,58 ^b [03,01-22,59]	95,29 ^d [89,20-101,36]	100 ^c [100-100]
Delta	2	70	30,69	25,71 ^a [15,05-39,97]	11,42 ^b [04,02-17,35]	44,28 ^d [27,12-74,50]	78,57 ^c [62,06-95,00]

Bend : Bendiocarb ; Delta : Deltaméthrine ; α -Cyper : Alpha-cyperméthrine ; Féni : Fénitrothion ; Chlor- Delta : Chlorpyriphos et Deltaméthrine.

Pour un même paramètre du tableau, les valeurs qui portent des lettres différentes en exposant, sont significativement différentes ($p<0,05$).

Tableau V : Données entomologiques relatives à l'impact des traitements sur les culicinés enregistrées au cours du 1^{er} mois après le traitement des cases (entrée libre des Culicinés).

Cases	Effectif des femelles capturées	Réduction du taux d'entrée (%)	Exophilie (%)	Taux des femelles gorgées (%)	Taux de mortalité immédiate (%)	Taux de mortalité générale (%)
Témoin	975	-	30,76 ^a	19,48 ^a	0,30 ^a	2,56 ^a
Bend	550	43,58	27,27 ^a [23,00-32,53]	16,36 ^b [14,22-19,00]	19,09 ^c [15,84-23,02]	38,36 ^c [35,46-41,35]
Delta	525	46,15	33,33 ^a [28,67-38,33]	14,28 ^b [09,58-20,07]	8,5 ^b [07,07-10,10]	20,95 ^b [17,74-23,79]
α-Cyper	601	38,35	33,44 ^a [31,74-35,72]	16,63 ^b [09,24-24,02]	11,81 ^b [05,57-18,05]	24,29 ^b [14,57-33,72]
Féni	805	17,43	21,73 ^a [18,41-24,63]	14,90 ^b [13,91-15,77]	31,18 ^e [27,80-34,13]	53,41 ^d [50,14-56,37]
Chlor- Delta	850	12,82	27,05 ^a [25,10-29,01]	14,11 ^b [12,79-15,45]	23,64 ^d [22,26-24,86]	52,11 ^d [49,22-55,21]

Bend : Bendiocarb ; Delta : Deltaméthrine ; α-Cyper : Alpha-cyperméthrine ; Féni : Fénitrothion ; Chlor- Delta : Chlorpyriphos et Deltaméthrine.

Pour un même paramètre du tableau, les valeurs qui portent des lettres différentes en exposant, sont significativement différentes ($p<0,05$).

Tableau VI : Données entomologiques relatives à l'impact des traitements sur *An. gambiae* enregistrées au cours des quatre premiers mois après le traitement des cases (lâcher de *Anopheles gambiae* : souche locale Akron).

Cases	Mois	Effectif des femelles capturées	Exophilie (%)	Taux des femelles gorgées (%)	Taux de mortalité immédiate (%)	Taux de mortalité générale (%)
Témoin	1	62	16,12 ^a	32,25 ^a	0 ^a	3,22 ^a
	2	73	27,39 ^a	13,69 ^a	0 ^a	2,73 ^a
	3	73	6,84 ^a	10,95 ^a	0 ^a	4,10 ^a
	4	49	42,85 ^a	10,20 ^a	0 ^a	6,12 ^a
Bend	1	60	25 ^b [21,92-28,16]	25 ^b [21,92-28,16]	50 ^e [43,86-56,31]	81,66 ^d [76,23-87,20]
	2	48	33,33 [28,28-38,31]	10,41 ^a [2,43-18,19]	72,91 ^d [67,44-78,50]	81,25 ^d [68,78-94,14]
	3	72	51,38 ^e [45,40-57,37]	8,33 ^a [08,33-8,33]	69,44 ^c [63,47-75,40]	77,77 ^c [71,79-83,76]
	4	46	63,04 ^d [54,68-71,42]	4,34 ^a [-05,11-14,01]	10,86 ^b [01,82-19,85]	47,82 ^d [35,72-60,11]
Delta	1	60	38,33 ^c [29,55-47,26]	16,66 ^d [07,31-19,24]	25 ^b [21,92-28,16]	66,66 ^b [62,45-70,95]
	2	52	71,15 ^d [68,80-73,47]	9,61 ^a [01,57-17,60]	7,69 ^b [-00,93-16,4]	67,30 ^c [59,88-74,76]
	3	63	23,80 ^b [23,81-23,81]	6,34 ^a [-00,48-13,17]	6,34 ^a [-00,48-13,17]	22,22 ^b [15,39-29,05]
	4	32	46,87 ^{ab} [40,44-53,49]	9,37 ^a [08,09-10,70]	3,12 ^a [-10,00-16,07]	28,12 ^b [24,26-32,09]
α -Cyper	1	60	35 ^c [30,70-39,42]	18,33 ^c [10,71-26,02]	26,66 ^b [22,15-31,11]	78,33 ^c [71,68-81,75]
	2	82	59,75 ^c [57,66-61,82]	12,19 ^a [07,60-16,73]	39,02 ^c [34,39-43,65]	60,97 ^b [56,34-65,60]
	3	78	42,30 ^c [42,31-42,31]	5,12 ^a [-00,37-10,63]	3,84 ^a [03,85-3,85]	24,35 ^b [18,85-29,86]
	4	34	55,88 ^{bcd} [38,81-73,31]	5,88 ^a [-06,97-19,10]	29,41 ^c [14,60-44,47]	35,29 ^c [31,01-39,70]
Féni	1	70	27,14 ^b [22,70-31,53]	24,28 ^b [18,65-29,90]	42,85 ^c [40,28-45,47]	85,71 ^d [80,54-90,96]
	2	43	67,44 ^d [58,43-76,49]	11,62 ^a [01,95-21,23]	74,4 ^d [65,25-83,63]	83,72 ^d [75,62-91,99]
	3	54	22,22 ^b [19,18-25,34]	3,7 ^b [-04,31-11,73]	68,51 ^c [56,65-80,65]	90,74 ^d [76,47-105,37]
	4	45	51,11 ^{bc} [41,55-60,66]	4,44 ^a [-05,11-14,01]	71,11 ^d [61,55-80,66]	77,77 ^f [65,99-85,11]
Chlor- Delta	1	80	25 ^b [20,89-29,07]	26,25 ^b [24,84-27,68]	46,25 ^d [41,64-50,86]	81,25 ^d [72,79-89,80]
	2	68	58,82 ^c [53,40-64,26]	8,82 ^a [08,28-9,40]	70,58 ^d [66,09-75,15]	82,35 ^d [76,92-90,67]
	3	67	35,82 ^d [33,56-38,09]	4,47 ^b [04,19-4,77]	61,19 ^b [55,50-66,89]	88,05 ^d [81,93-94,21]
	4	49	57,14 ^{cd} [45,17-60,66]	2,04 ^b [-06,88-11,05]	28,57 ^c [20,57-36,53]	63,26 ^e [60,07-66,41]

Bend : Bendiocarb ; Delta : Deltaméthrine ; α -Cyper : Alpha-cyperméthrine ; Féni : Fénitrothion ; Chlor- Delta : Chlorpyriphos et Deltaméthrine.

Pour un même paramètre du tableau, les valeurs qui portent des lettres différentes en exposant, sont significativement différentes ($p<0,05$).

2-3- Effets des traitements des cases sur les dormeurs.

Ces résultats sont consignés dans le tableau VII qui montre que les désagréments signalés par les dormeurs ont été notés uniquement dans les cases traitées au fénitrothion et au mélange chlorpyriphos+ deltaméthrine. Pour les avantages ressentis, les captureurs ont tous affirmé qu'il y a moins de nuisance de moustiques dans les cases traitées que dans leurs maisons et la case témoin. Pour la question souhaiteriez-vous poursuivre l'expérimentation, tous les captureurs –dormeurs ont répondu oui.

Tableau VII : Récapitulation des impressions recueillies des captureurs sur les effets des cases après le quatrième mois de traitement.

Case	Effets signalés	Nombre de captureurs
Témoin	Néant	6
Bendiocarb	Néant	6
Deltaméthrine	Néant	6
Alpha-Cyperméthrine	Néant	6
Fénitrothion, Chlorpyriphos et Deltaméthrine	Eternuement, écoulement de larmes et brûlures des yeux Sensation d'odeur désagréable	1 6

3-Discussion et conclusion.

3-1-Discussion

Les résultats des captures avant le traitement des cases ont montré que l'attractivité des cases pour les moustiques a été homogène. Toutefois, les cases 2 et 5 se sont comportées comme les moins attractives pour l'ensemble des moustiques. Par ailleurs, le pic observé au niveau de la case 6 pour les culicinés et celui au niveau de la case 3 pour les anophèles, pourraient se justifier par la proximité des gîtes à moustiques par rapport à certaines cases. La réduction du taux d'entrée des anophèles et des culicinés a été plus significative avec la deltaméthrine, l'alpha-cyperméthrine et le bendiocarb. Quant au fénitrothion et au mélange chlorpyriphos + deltaméthrine, la réduction observée a été très faible en raison probablement du groupe auquel

ces deux insecticides appartiennent. En effet, les organophosphorés ne sont pas connus pour leur action répulsive comme les pyréthrinoïdes (deltaméthrine et la l'alpha-cyperméthrine) qui exercent un effet répulsif important sur les moustiques (Darriet, 1991).

L'exophilie naturelle de *An. gambiae* a varié tout au long de l'évaluation. Le degré le plus bas (6,8%) a été observé en décembre et le plus élevé en janvier (42,8%). Il est très difficile d'expliquer cette variation dans la mesure où il s'agit de la même période. En effet, les deux mois correspondent au début de la saison sèche et de l'harmattan, ce qui ne peut pas être justifié par un changement de comportement ni des hommes (les habitants d'Akron), ni des anophèles. Ces données sont celles de la case témoin. Dans les cases où les murs ont été traités à la deltaméthrine et à l'alpha-cyperméthrine, l'exophilie induite sur *An.gambiae* et les culicinés entrés librement dans les cases a été plus élevée. Cela se justifie probablement par l'action pyréthrinoïde qui exerce un effet répulsif important sur les moustiques par rapport aux organophosphorés et aux carbamates. Les mêmes observations sont faites sur les moustiques lâchés. Deux mois après le traitement des cases, il a été observé une forte exophilie de 71,1% due à la présence de la deltaméthrine et de 59,7% à l'alpha-cyperméthrine. Par ailleurs, l'exophilie induite sur les *An. gambiae* lâchés par le fénitrothion et le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine a été relativement élevée. La forte exophilie due aux carbamates et aux organophosphorés pourrait se justifier par le fait que les femelles *An.gambiae* lâchés auraient perdu la vigueur après leur séjour au laboratoire.

Le traitement des cases-pièges n'a pas empêché une proportion non négligeable d'anophèles de se gorger sur leur hôte au début des expériences. Ces repas de sang des anophèles auraient été facilités par le fait que les moustiquaires installées dans les cases ne sont pas imprégnées. Par ailleurs, les captureurs ont parfois dormi le pied hors de la moustiquaire. C'est pour cette dernière raison que nous leur avons demandé de se coucher au milieu du lit et d'éviter de se coller à la moustiquaire. Grâce à ces précautions, le taux de gorgement des anophèles au 2^{ème} mois a baissé de façon significative : autour de 10% dans la case témoin et à peine à 5% dans les cases traitées . Toutefois, ces derniers résultats sont ceux des anophèles sauvages élevés et lâchés qui pourraient ne pas avoir la même appétence que les moustiques attirés par les hôtes et qui entrent librement dans les cases. De plus, le fait que la deltaméthrine, l'alpha-cyperméthrine et le bendiocarb ne réduisent pas de façon significative le taux de gorgement ($p > 0,05$) contrairement au fénitrothion et au mélange chlorpyriphos + deltaméthrine ($p < 0,05$), pourrait s'expliquer par la mortalité immédiate importante exercée par ces deux organophosphorés (91,7% et 95,3% au 1^{er} mois). En effet, les moustiques une fois entrés dans les cases meurent et n'ont pas le temps de se gorger.

La mortalité exercée sur les culicinés a été seulement de 53,4% avec le fénitrothion au 1^{er} mois où on devrait avoir un effet choc. Cela pourrait s'expliquer par la résistance de ces culicinés en majorité représentés par les *Culex* et les *Mansonia* vis-à-vis des produits insecticides utilisés. Des résultats similaires ont montré une résistance de *Culex quinquefasciatus* aux organophosphorés, aux carbamates et aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'ouest (Chandre, 1998). Par contre, en présence du fénitrothion et du mélange chlorpyriphos + deltaméthrine, les anophèles qui sont entrés dans les cases n'ont pas résisté à l'action létale de ces deux produits (100% de taux de mortalité) et du bendiocarb (92,8%). Cette efficacité a confirmé les études antérieures en Côte d'Ivoire (Asidi et al., 2005) pour le chlorpyriphos et au Zimbabwe (Mpofu et al., 1991) pour le bendiocarb. Concernant la deltaméthrine et l'alpha-cyperméthrine, à partir du 3^{ème} mois de traitement, les mortalités observées sont inférieures à 36%. La différence d'effet entre les pyréthrinoïdes et les trois autres insecticides pourrait s'expliquer par la résistance des anophèles vis-à-vis des pyréthrinoïdes (Akogbéto et Yakoubou, 1999). Malgré l'efficacité du fénitrothion et du mélange chlorpyriphos + deltaméthrine, ces insecticides ont une odeur désagréable, d'après les impressions des captureurs. Nous confirmons ces impressions, pour avoir participé à l'expérimentation et dormi dans les cases traitées.

3-2-Conclusion.

Après quatre mois de suivi de l'efficacité des cinq produits, le Sumithion 40 WP, le Master Quick ZC et le Ficam M se sont comportés comme des insecticides efficaces contre les anophèles résistants aux pyréthrinoïdes. Toutefois, la rémanence de Ficam M est plus faible, inférieure à 4 mois. Malgré cette faible durée d'efficacité, le Ficam M apparaît, dans le contexte actuel, le meilleur insecticide parmi les trois produits. En effet, le Master Quick ZC n'est pas encore homologué par l'Organisation Mondiale de la Santé et ne peut être importé au Bénin pour son utilisation en santé publique. Concernant, le Sumithion 40 WP, c'est un produit très efficace en pulvérisation intradomiciliaire, mais dont l'odeur et les effets secondaires ne sont pas appréciés par les volontaires qui ont passé des nuits dans les chambres traitées avec ce produit. Dans le contexte actuel de forte résistance de *An. gambiae* à la perméthrine au Bénin, ces trois produits constituent une bonne alternative aux pyréthrinoïdes. Le bendiocarb paraît prometteur en pulvérisation intradomiciliaire pour le contrôle des populations de vecteurs résistants aux pyréthrinoïdes, toutefois, il est souhaitable de disposer de formulations plus rémanentes.

Chapitre 4 : Données de base entomologique et sociologique en prélude à la campagne de pulvérisation intradomiciliaire et à l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées (Permanet 2.0) dans les communes de Sèmè-Kpodji, Dangbo, Misséréto et Adjohoun.

1-Introduction

Le paludisme constitue un véritable problème de santé publique et de développement. De nombreux efforts ont été déployés depuis plusieurs années pour réduire l'incidence de cette maladie. Malgré ces efforts, les résultats obtenus sont en deçà de ceux escomptés. La principale raison est la résistance du principal parasite, *Plasmodium falciparum*, aux antipaludiques et celle du vecteur, *Anopheles gambiae*, aux pyréthrinoides utilisés pour imprégner les moustiquaires. Face à cette situation, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Bénin s'est engagé dans un programme de pulvérisation intradomiciliaire (PID) à base de bendiocarb dans les communes de Sèmè-Kpodji, Dangbo, Missérété et Adjohoun.

Mais avant la mise en place de cette intervention, des données de base sont nécessaires pour déceler les difficultés éventuelles liées à la mise en œuvre de cette stratégie. En effet, le succès de la PID est lié, entre autres, à l'adhésion des populations à la stratégie, à des critères entomologiques et à la nature des supports à traiter. Sur le plan entomologique, la dynamique de population du principal vecteur du paludisme, *An. gambiae*, son comportement de piqûre, ses lieux de repos et sa sensibilité aux insecticides sont des données de base nécessaires. Les paramètres directement liés à la capacité vectorielle, en particulier, l'âge physiologique et le taux d'inoculation entomologique (TIE) constituent les indicateurs de base sur lesquels reposera la mesure de l'impact de l'intervention à mettre en place. Les données relatives à ce chapitre sont présentées en détails dans les articles 2 et 3 en annexe, mais nous reprenons ici les points essentiels relatifs aux résultats et à la discussion.

Article 2 : Padonou G G, Gbédjissi G L, Bankolé H S, Noukpo H, Yadouléton A, Akogbéto MC (2011). Studying physical and sociological environment of malaria to implement an indoor insecticide spraying campaign in Oueme region, Benin. *J. Public. Health Epidemiol* 3(13): 622-631

Article 3 : Padonou G G, Sezonlin M, Gbedjissi G L, Ayi I, Azondekon R, Djenontin A, Bio-Bangana S, Oussou O, Yadouleton A , Boakye D, Akogbeto M (2011). Biology of *Anopheles gambiae* and insecticide resistance: Entomological study for a large scale of indoor residual spraying in South East Benin. *J. Parasitol. Vector Biol. ,* 3(4): 59-68.

2-Etude de l'environnement physique et sociologique du paludisme en prélude à la mise en œuvre d'une campagne de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dans le département de l'Ouémé au Bénin

2-1-Résultats

2-1-1- Connaissances, attitudes et pratiques des populations sur le paludisme et ses vecteurs

2-1-1-1-Les connaissances des populations sur le paludisme et son vecteur.

Les femmes ont constitué 75,9% ($n = 2450$) des 3228 chefs de ménages qui ont été interviewés. 42,5% des répondants sont analphabètes (tableau VIII). Le plus fort taux d'analphabétisme a été observé chez les femmes et était de 60,1 contre 49,2% pour les hommes. La piqûre de moustique est la plus redoutée (54,4%) des nuisances de moustiques pour les populations dans les 4 communes. La connaissance sur la cause du paludisme a été relativement faible dans les 4 communes et a été respectivement de 21,8, 34,2, 26,3, et 35,8% à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè, (tableau VIII). Seulement 953 (29,5%) de l'ensemble des enquêtés ont déclaré que le paludisme est causé par une piqûre de moustique par rapport à 2275 répondants (70,5%) qui ne connaissaient pas la cause du paludisme.

En ce qui concerne la gravité du paludisme, 38,9 % des populations ont déclaré que cette maladie est mortelle (Tableau VIII). Les symptômes (tableau VIII) les plus évoqués sont : corps chaud (53 %), fatigue (15,90 %) et maux de tête (14,30 %). Pour la prise en charge à domicile, les pratiques adoptées sont la médecine traditionnelle (56,3%) et l'utilisation des molécules antipaludiques modernes (43,70%). Le traitement du paludisme commence à domicile par l'automédication qui est une pratique très courante au Bénin. Mais en cas de persistance des signes cliniques, les populations se rendent dans les formations sanitaires pour se faire traiter. En effet, lors des discussions de groupe, les participants ont déclaré: "Il est imprudent de tenter l'automédication en utilisant la médecine traditionnelle ou les médicaments modernes, en cas de fièvre. Nous sommes pauvres et il faut parcourir de grandes distances pour atteindre le centre de santé le plus proche. Mais après l'échec de l'automédication, nous sommes obligés d'aller à l'hôpital pour nous faire traiter".

Tableau VIII : Niveau d'instruction, perceptions des individus et des pratiques liées au paludisme et ses vecteurs, selon les localités.

Variable	Adjohoun		Dangbo		Missérété		Sèmè		Total		
	N	P %	N	P %	N	P %	N	P %	N	P %	
Niveau d'instruction	Sait lire et écrire	381	47.2 ^a	306	37.9 ^a	344	42.6 ^a	342	42.3 ^a	1373	42.5 ^a
	Ne sait pas lire et écrire	426	52.7 ^a	501	62 ^b	463	57.3 ^b	465	57.6 ^b	1855	57.4 ^b
Perception du paludisme et nuisances du moustique	Aucun	3	0.4 ^a	0	0.0 ^a	3	0.4 ^a	9	1.1 ^a	15	0.5 ^a
	Piqûre	479	59.4 ^c	415	51.4 ^c	491	60.8 ^c	372	46.1 ^c	1757	54.4 ^c
	Paludisme	176	21.8 ^d	276	34.2 ^d	212	26.3 ^d	289	35.8 ^d	953	29.5 ^d
	Insomnie	61	7.6 ^b	26	3.2 ^b	35	4.3 ^b	54	6.7 ^b	176	5.5 ^b
	Bruit	88	10.9 ^c	90	11.2 ^c	66	8.2 ^c	83	10.3 ^c	327	10.1 ^c
Perception de la gravité du paludisme	Bénigne	36	4,50 ^a	36	4,50 ^a	28	3,50 ^a	41	5,10 ^a	141	4,40 ^a
	Fatale	312	38,70 ^c	312	38,70 ^c	318	39,40 ^c	315	39,00 ^c	1257	38,90 ^c
	Grave	151	18,70 ^b	155	19,20 ^b	161	20,00 ^b	163	20,20 ^b	630	19,50 ^b
	Très grave	308	38,20 ^c	304	37,70 ^c	300	37,20 ^c	288	35,70 ^c	1200	37,20 ^c
Symptômes du paludisme	Douleurs	108	13,40 ^c	115	14,30 ^c	114	14,10 ^c	124	15,40 ^c	461	14,30 ^c
	Diarrhée	24	3,00 ^a	33	4,10 ^a	31	3,80 ^a	31	3,80 ^a	119	3,70 ^a
	Vertige	26	3,20 ^a	31	3,80 ^a	28	3,50 ^a	30	3,70 ^a	115	3,60 ^a
	Fièvre	453	56,10 ^d	426	52,80 ^d	421	52,20 ^d	411	50,90 ^d	1711	53,00 ^d
	Maux de tête	60	7,40 ^b	64	7,90 ^b	68	8,40 ^b	73	9,00 ^b	265	8,20 ^b
	Fatigue	125	15,50 ^c	127	15,70 ^c	134	16,60 ^c	128	15,90 ^c	514	15,90 ^c
Pratiques médicales	Perte de poids	11	1,40 ^a	11	1,40 ^a	11	1,40 ^a	10	1,20 ^a	43	1,30 ^a
	Médecine moderne	353	43.7 ^a	355	44 ^a	350	43.40 ^a	353	43.70 ^a	1411	43.7 ^a
	Médecine traditionnelle	454	56.3 ^b	452	56 ^b	457	56.6 ^b	454	56.3 ^b	1777	56.3 ^b

N: Effectif des répondants ; P % : Proportion des répondants dans la commune ; pour chaque commune, les taux de la même colonne portant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents ($P>0,05$).

2-1-1-2-Les moustiquaires et autres mesures utilisées pour lutter contre les moustiques.

Dans la zone d'étude 1042 personnes (32,3%) dorment sous moustiquaires imprégnées et 695 (21,5%) dorment sous moustiquaires ordinaires (tableau IX). Ces moustiquaires (53,8%) sont les principaux moyens de prévention utilisés contre les piqûres de moustiques. Toutefois, certaines personnes signalent une sensation de chaleur (12,3%) en dormant sous une moustiquaire (tableau IX); pour d'autres, c'est la sensation d'étouffement (0,7%) qui a été évoquée. Ceux qui n'ont pas de moustiquaires utilisent les spirales (serpentins fumigènes) (27,6%) et les aerosols (10,7%). Les moyens les moins utilisés sont la fumée (2,4%) et les plantes locales (2,4%) (tableau IX). Par ailleurs d'autres méthodes telles que l'utilisation des grillages pour les fenêtres, les pommades répulsives et les pagnes pour se couvrir ont été signalées dans des proportions similaires (tableau IX). Ces mesures pratiques de lutte contre

les moustiques sont les mêmes d'une commune à l'autre ($P > 0,05$). Par ailleurs, lors des discussions de groupe, les répondants ont indiqué que la plupart des moustiquaires imprégnées qu'ils possèdent ont été gratuitement fournis par le PNLP. Certains participants ont déclaré: "La distribution gratuite de moustiquaires initiée par le Président de la République doit continuer pour que tout le monde puisse avoir de moustiquaires." Plus de la moitié de la population (61%) estime que les moustiquaires réduisent le contact homme-moustique. En outre, 23,7 % des enquêtés ont fait le lien entre les moustiquaires et la réduction du paludisme alors que 11,1% ont établi un lien avec la réduction des maladies de façon globale (tableau IX).

Tableau IX: Moyens de protection contre les moustiques

Variable	Adjohoun		Dangbo		Missérétré		Sèmè		Total		
	N	P %	N	P %	N	P %	N	P %	N	P %	
Moyens utilisés	Couverture Moustiquaires imprégnées	18	2.2 ^b	16	2 ^b	6	0.7 ^a	12	1.5 ^a	52	1.6 ^b
	Plantes locales	257	31.8 ^e	279	34.6 ^f	241	29.9 ^c	265	32.8 ^d	1042	32.3 ^f
	Pommades	20	2.5 ^b	18	2.2 ^b	21	2.6 ^a	18	2.2 ^a	77	2.4 ^b
	Moustiquaires ordinaires	9	1.1 ^b	9	1.1 ^b	7	0.9 ^a	7	0.9 ^a	32	1 ^b
	Fumée	168	20.8 ^d	157	19.5 ^d	190	23.5 ^c	180	22.3 ^c	695	21.5 ^d
	Serpentins	24	3 ^b	22	2.7 ^b	15	1.9 ^a	17	2.1 ^a	78	2.4 ^b
	Bombes insecticides	224	27.8 ^e	225	27.9 ^e	227	28.1 ^c	215	26.6 ^{cd}	891	27.6 ^e
	Grillage	84	10.4 ^c	78	9.7 ^c	95	11.8 ^b	88	10.9 ^b	345	10.7 ^c
		3	0.4 ^{ab}	3	0.4 ^{ab}	5	0.6 ^a	5	0.6 ^a	16	0.5 ^{ab}
Avantages des moustiquaires	Réduction des maladies	94	11.6 ^c	93	11.5 ^c	75	9.3 ^c	95	11.8 ^c	357	11.1 ^c
	Réduction des moustiques	494	61.2 ^e	475	58.9 ^e	520	64.4 ^e	480	59.5 ^e	1969	61 ^e
	Réduction des insectes	26	3.2 ^b	31	3.8 ^b	30	3.7 ^b	30	3.7 ^b	117	3.6 ^b
	Réduction du paludisme	187	23.2 ^d	203	25.2 ^d	177	21.9 ^d	197	24.4 ^d	764	23.7 ^d
	Autres	6	0.7 ^a	5	0.6 ^a	5	0.6 ^a	5	0.6 ^a	21	0.7 ^a
Inconvénients des moustiquaires	Aucun	693	85.9 ^c	693	85.9 ^c	695	86.1 ^c	693	85.9 ^c	2774	85.9 ^c
	Chaleur	100	12.4 ^b	100	12.4 ^b	95	11.8 ^b	101	12.5 ^b	396	12.3 ^b
	Autres	6	0.7 ^a	6	0.7 ^a	6	0.7 ^a	5	0.6 ^a	23	0.7 ^a
	Suffocation	8	1 ^a	8	1 ^a	11	1.4 ^a	8	1 ^a	35	1.1 ^a

N: Effectif des répondants ; P % : Proportion des répondants dans la commune ; pour chaque commune, les taux de la même colonne portant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents ($P>0,05$).

2-1-1-3-Perceptions et acceptabilité des populations pour la PID

Un total de 1985 (61,5 %) des enquêtés a déclaré connaître la méthode de la PID sur les murs (Tableau X). Le taux le plus élevé a été observé à Sémè (74%) et le plus bas à Dangbo (54,9%). Un taux de 43,4% des répondants a affirmé que la PID contribue à réduire les moustiques (tableau X). D'autres personnes (31,1%) ont dit qu'elle a un impact sur d'autres insectes telles que les blattes dans les maisons traitées. Ceci a été également révélé au cours du focus group par un enquêté qui a déclaré :"quand le jour de la pulvérisation approche, on nous avertit et on range les animaux domestiques". Seulement 9,70% des répondants ont affirmé que la PID contribue à baisser la transmission du paludisme. Par contre, 66 % n'ont trouvé aucun inconvénient aux pulvérisations intradomiciliaires (tableau X). Cependant, certains ont affirmé craindre les mauvaises odeurs (8,80 %) que dégagent les insecticides et la toxicité (24,10 %). D'autres ont dit qu'ils ignorent si cela peut causer de maladies : " Quand on pulvérise, cela tue les moustiques et toutes sortes d'insectes. Mais je ne sais pas si cela peut causer de maladie " a affirmé un autre enquêté lors du focus group. D'autres, ont aussi rapporté : " Nous adhérons entièrement aux campagnes de pulvérisation mais la dose d'insecticide à utiliser doit être modérée. Oui à la pulvérisation, mais ne nous trompez pas en utilisant un colorant à la place de l'insecticide. Dites nous quel produit vous voulez utiliser". Les différentes déclarations sur les avantages de la PID ont été enregistrées avec les mêmes fréquences ($P>0,05$) dans toutes les communes et ont confirmé le taux d'acceptabilité élevé (98,70 %) pour la pulvérisation de façon uniforme dans toutes les communes (tableau X).

Tableau X : Expériences et perceptions des communautés sur les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticide.

Variable	Adjohoun		Dangbo		Missérété		Sèmè		Total		
	N	P %	N	P %	N	P %	N	P %	N	P %	
Connaissance de la PID	Non	459	56.9 ^b	443	54.9 ^b	486	60.2 ^b	597	74 ^b	1985	61.5 ^b
	Oui	348	43.1 ^a	364	45.1 ^a	321	39.8 ^a	210	26 ^a	1243	38.5 ^a
Inconvénients de la PID	Aucun	540	66.9 ^d	534	66.2 ^d	531	65.8 ^d	525	65.1 ^d	2130	66 ^d
	Mauvaise odeur	68	8.4 ^b	70	8.7 ^b	73	9 ^b	73	9 ^b	284	8.8 ^b
	Ne sait pas	9	1.1 ^a	8	1 ^a	10	1.2 ^a	10	1.2 ^a	37	1.1 ^a
	Toxique	190	23.5 ^c	195	24.2 ^c	193	23.9 ^c	199	24.7 ^c	777	24.1 ^c
Avantages de la PID	Ne sait pas	31	3.8 ^b	25	3.1 ^a	19	2.4 ^a	29	3.6 ^b	104	3.2 ^b
	Réduction des maladies	91	11.3 ^c	85	10.5 ^b	79	9.8 ^b	108	13.4 ^d	363	11.2 ^d
	Réduction des moustiques	335	41.5 ^e	392	48.6 ^d	331	41 ^d	342	42.4 ^f	1400	43.4 ^f
	Réduction des insectes	260	32.2 ^d	226	28 ^c	277	34.3 ^c	242	30 ^e	1005	31.1 ^e
	Réduction du paludisme	75	9.3 ^c	67	8.3 ^b	90	11.2 ^b	80	9.9 ^c	312	9.7 ^c
	Autres	15	1.9 ^a	12	1.5 ^a	11	1.4 ^a	6	0.7 ^a	44	1.4 ^a
Acceptabilité de la PID	Non	11	1.4 ^a	10	1.2 ^a	13	1.6 ^a	7	0.9 ^a	41	1.3 ^a
	Oui	796	98.6 ^b	797	98.8 ^b	794	98.4 ^b	800	99.1 ^b	3187	98.7 ^b

N: Effectif des répondants ; **P % :** Proportion des répondants dans la commune ; pour chaque commune, les taux de la même colonne portant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents ($P>0,05$).

2-1-1-4- Relation entre la perception de la PID, le niveau d'instruction, les pratiques médicales et le sexe

La régression logistique multivariée effectuée pour tester les associations entre la connaissance de la PID et les covariables du sexe, du niveau d'éducation et de la pratique médicale a indiqué que l'odds ratio (OR) associé avec le sexe est de 0,62 avec [0,53-0,74] pour intervalle de confiance et $p = 0,0$ (tableau XI). Ceci reflète une importante association entre le sexe et la connaissance de la PID et montre que les femmes connaissaient mieux la PID que les hommes. Il y a également eu une association significative entre le niveau d'instruction et la connaissance de la PID ($OR = 1,84 [1,58 à 2,15] p= 0,0$) (tableau XI). Les répondants instruits connaissent mieux la PID que les non instruits. Par ailleurs, la connaissance de la PID a été significativement associée avec les pratiques médicales ($OR =$

0,75 [0,65 à 0,87] p = 0,0). Cette association a révélé une meilleure compréhension de la PID par les praticiens de la médecine traditionnelle que ceux de la médecine moderne.

En ce qui concerne, l'association entre l'acceptation de la PID et le sexe elle n'a pas été significative (OR = 1,18 [0,54 à 2,58]) (tableau XII). Le taux d'acceptation de la PID chez les hommes ne diffère pas significativement de celle des femmes. De même l'association entre l'acceptation de la PID et les pratiques médicinales n'a pas été significative (OR = 0,85 [0,45 à 1,59]) (tableau XII). Cependant, il y a eu une association significative entre le niveau d'instruction et l'acceptation de la PID (OR = 2,70 [1,27 à 5,74]) (tableau XII).

Le taux d'acceptabilité de la PID chez les personnes instruites a été significativement plus élevé que chez les personnes non instruites.

Tableau XI. Associations entre la connaissance de la PID, le sexe, le niveau d'instruction et les pratiques médicales

Covariables	Coefficients estimés	p	OR et CI 95%
intercept	0.4765	0.007	
sexe (homme)	-0.4716	0.00	0.62 [0.53 - 0.74]
niveau d'instruction (>CM1)	0.6118	0.00	1.84 [1.58 - 2.15]
médecine moderne	-0.2883	0.0001	0.75 [0.65 - 0.87]

Niveau d'instruction (> CM1): Peut lire et écrire; OR: Odds Ratio; CI: Intervalle de confiance.

Tableau XII. Associations entre l'acceptation de la PID, le sexe, le niveau d'instruction et les pratiques médicales

Covariables	Coefficients estimés	p	OR et CI 95%
intercept	4.0713	0.000	
sexe (homme)	0.1682	0.673	1.18 [0.54 - 2.58]
niveau d'instruction (>CM1)	0.9940	0.009	2.70 [1.27 - 5.74]
médecine moderne	-0.1610	0.616	0.85 [0.45 - 1.59]

Niveau d'instruction (> CM1): Peut lire et écrire; OR: Odds Ratio; CI: Intervalle de confiance.

2-1-2- Les types d'habitats rencontrés et leurs états.

Dans les 4 communes, les habitations humaines sont en majorité construites avec des supports en ciment et en banco (figures 26 et 27). En effet, sur les 5 164 lieux de couchages recensés, 54,35% (2807/5164) étaient en ciment et 30,51% en terre de barre. Ceux qui sont construits

en bambou et en bois ne représentent respectivement que 11,13% et 3,71%. Si la commune de Dangbo a été caractérisée par l'habitat le plus modeste avec la plus forte proportion de cases en terre de barre (40,76%), Sèmè présentait l'aspect relativement plus moderne avec la plus forte proportion d'habitations en ciment (73,48%) (figure 28). La plupart des murs en ciment et banco (71,51% : 3693/5164) étaient lisses présentant ainsi des surfaces qui se prêtent bien au traitement insecticide. Les murs à surface rugueuse (28,49%) sont essentiellement ceux qui sont en terre de barre. Seulement 10% environ des maisons visitées présentent des ouvertures qui facilitent l'entrée et la sortie des moustiques (figures 29, 30, 31). Il s'agit des espaces entre le mur et le toit, des fentes au travers des murs et des trous sur les plafonds (figure 30).



Figure 26 : Habitats en banco à Dangbo



Figure 27 : Habitats en bambou et en ciment construites côté à côté, dans l'arrondissement de Aholouyémè à Sèmè

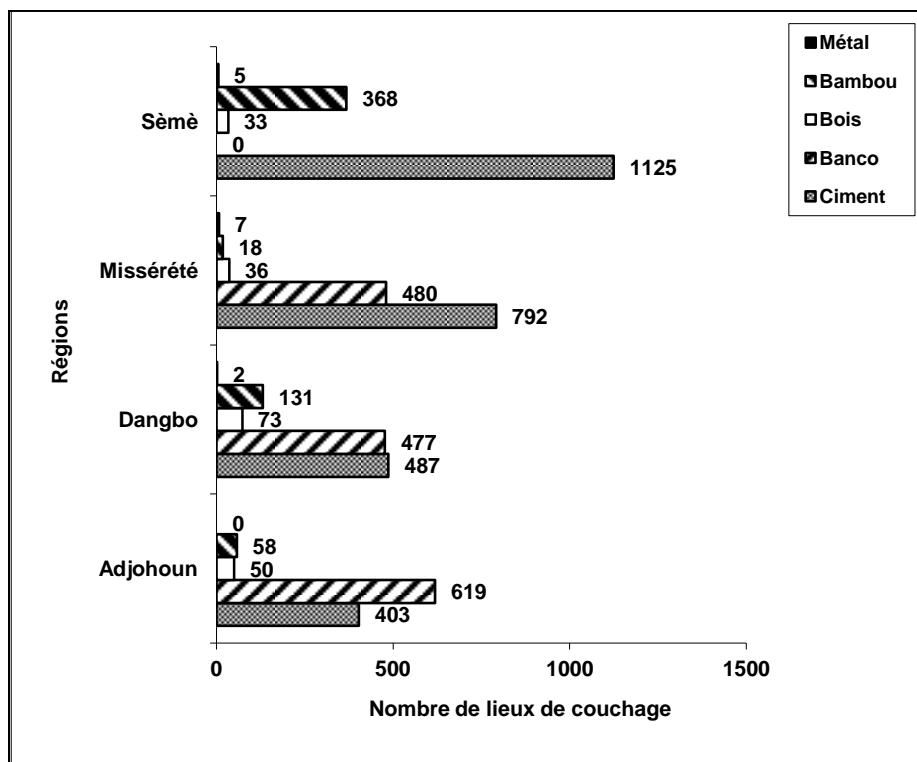


Figure 28 : Effectif des types d'habitats en fonction de la nature des supports dans les 4 communes

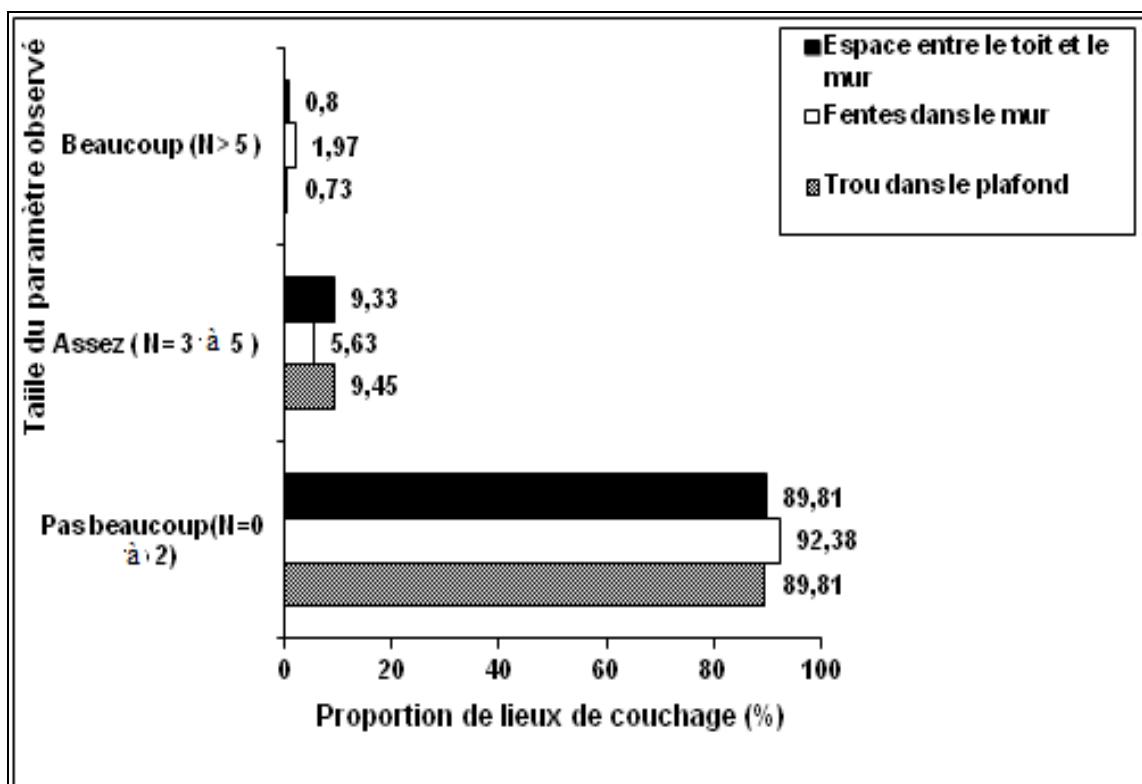


Figure 29 : Proportion des chambres présentant des ouvertures pouvant faciliter l'entrée et la sortie des moustiques dans l'ensemble des 4 communes



Figure 30 : Habitat présentant beaucoup d'espace entre le mur rugueux et le toit avec de nombreuses fentes dans les murs (Dangbo)



Figure 31 : Habitat avec un plafond sans trou, le mur lisse sans fente et sans espace (Dangbo)

2-2-Discussion et conclusion

2-2-1-Discussion

Les résultats ont montré dans les 4 communes que la majorité des répondants ont des idées fausses concernant la cause du paludisme. Seulement 29,5% des répondants ont lié le paludisme à la piqûre des moustiques. Des résultats similaires ont été observés, dans des études antérieures effectuées au Nigéria (Okafor et Okeke, 2008) et dans la communauté Ndu du Cameroun (Shey *et al.*, 2011). Les résultats obtenus dans la présente étude pourraient se justifier par la culture des communautés du sud du Bénin qui considèrent le soleil comme l'une des principales causes du paludisme. En effet le paludisme est communément appelé "Wévozon" dans la langue locale Goun, traduite en français comme suit : "maladie du soleil". Cette idée erronée s'explique par un faible niveau de scolarisation et le manque d'informations sur la biologie des moustiques. Ces résultats suggèrent la nécessité d'un programme d'éducation sanitaire à l'endroit de la communauté locale.

Si 29,50% de la population font le lien entre le paludisme et les moustiques, 54,4% redoutent les piqûres de ces insectes. Cette observation a été faite à Bouaké où le principal gène des moustiques est la nuisance occasionnée par leurs piqûres douloureuses et les troubles du sommeil qui résultent de leur bruit (Doannio *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'automédication a été jugée comme une pratique courante dans les 4 communes. Cette pratique confirme les taux

faibles de fréquentation des services de santé (32, 41, 20 et 40% à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè respectivement) (Ministère de la Santé de la République du Bénin, 2007). Les mêmes causes ont été signalées dans des études menées au Togo (Derming *et al.*, 1989) et en Tanzanie (Kinung'hi *et al.*, 2010). La faible fréquentation des centres de santé, se justifie également par la non disponibilité des médecins dans les formations sanitaires, le mauvais accueil réservé aux patients par le personnel, les attentes prolongées avant l'arrivée du médecin, l'indisponibilité de médicaments et la distance qui sépare le domicile du centre de santé (Igun, 1987; Ruebush, 1995; Okeke et Okafor, 2008).

La diversité des mesures de prévention contre les piqûres de moustiques constatée dans toutes les communes a été rapportée à Kafiné en Côte d'Ivoire (Doannio *et al.*, 2004). Il est très surprenant que seulement 23,7% des répondants établissent un lien entre la réduction du paludisme et les moustiquaires. Ceci s'explique probablement par les idées fausses concernant la cause du paludisme. Dans une étude menée au Ghana (Agyepong, 1999) il a été montré que la compréhension de la transmission du paludisme par les moustiques n'influence pas la pratique d'utilisation des moustiquaires. La principale raison de l'utilisation des moustiquaires est la protection contre les piqûres de moustiques et pas nécessairement la prévention du paludisme. Par ailleurs, l'utilisation généralisée des spirales et des aérosols dans la zone d'étude pourrait se justifier par la disponibilité, sur tous les marchés, des serpentins et des bombes aérosols, leur coût relativement bas et la possibilité de les acquérir en détail. Quant aux plantes à essence répulsive, elles sont faiblement utilisées (2,40%) probablement à cause de leur efficacité de courte durée. N'eut été le coût relativement élevé des moustiquaires, le taux d'utilisation indiqué (53,8%) serait plus élevé. En effet les populations avaient révélé que les moustiquaires qu'elles possèdent proviennent en majorité de distribution gratuite. Toutefois, la chaleur, la suffocation, certaines croyances et tabous semblent être également des obstacles à l'utilisation des moustiquaires. Des études antérieures dans le nord du Ghana ont indiqué que des facteurs saisonniers, les modes d'utilisation, et les questions de coût ont été des facteurs clés susceptibles d'influer sur la diffusion et l'efficacité des moustiquaires (Binka et Adongo, 1997).

Le taux élevé d'acceptabilité de la PID pourrait être expliqué par l'expérience individuelle des populations basée sur les pulvérisations faites au sein des ménages par les chefs de famille dans les chambres à coucher avec des bombes aérosols et par la forte médiatisation des mesures préventives contre le paludisme. A cela s'ajoute le souvenir des effets bénéfiques des opérations de pulvérisations intradomiciliaires organisées par le Ministère de la Santé entre 1983 et 1989 dans les agglomérations de Cotonou (Akogbétó, Communication personnelle).

Par contre, certaines personnes ont quelques appréciations de méfiance surtout en ce qui concerne la toxicité des insecticides et leurs mauvaises odeurs. Une bonne sensibilisation permettra de réduire ces réticences. Nos résultats ont aussi montré que les femmes connaissaient la PID mieux que les hommes. Ces résultats sont semblables à ceux d'autres études (Raikes, 1989; Shey et al, 2011) et pourraient être expliqués par la présence quasi-permanente de la femme au foyer. Le niveau d'instruction a influencé la connaissance de la PID. Les répondants instruits sont plus informés de la PID que les non instruits (Sharma *et al*, 2003.; Comores *et al.*, 2003). Par ailleurs, les praticiens de la médecine traditionnelle connaissaient aussi mieux la PID que les praticiens de la médecine moderne. Cela pourrait s'expliquer par l'habitude des praticiens de la médecine traditionnelle à vivre généralement dans les zones rurales où les moustiques sont nombreux et le paludisme plus endémique contrairement aux praticiens de la médecine moderne qui vivent en milieu urbain où les conditions sont moins favorables aux moustiques. Ceci justifie le fait qu'ils sont moins familiers aux mesures de protection que ceux des zones rurales (Jones *et al.*, 2007).

Le nombre important d'habitations construites avec des supports en banco à Dangbo, Missérétré et Adjohoun, se justifie par le faible niveau de vie des populations. Ces supports de type banco nécessiteraient l'utilisation de quantités importantes d'insecticides lors de la pulvérisation, en raison de la forte porosité de la terre de barre. Mais 71,51% de ces murs sont crépis avec un mélange de sable et ou du ciment, ce qui devait atténuer le degré de porosité. Par contre, à Sèmè, les maisons sont construites en ciment. Ce type d'habitat est également rencontré en faible proportion à Dangbo, Missérétré et Adjohoun, ce qui est un atout en raison des surfaces lisses offertes (Najera et Zaïm, 2004). A Sèmè, les palmiers et les cocotiers sont exploités pour la construction d'habitats en bambou et en paille. C'est aussi le cas de certains villages notamment de la vallée à Dangbo et Adjohoun. Ces habitations en bambous et en paille comportent souvent de larges ouvertures entre le mur et le toit qui facilitent l'entrée et la sortie de nombreux anophèles. Une pulvérisation intradomiciliaire dans de tels habitats n'est pas souhaitable en raison de la facilité pour les moustiques de fuir l'insecticide. La stratégie souhaitable pour ces types de maisons est l'utilisation des moustiquaires. Un autre handicap rencontré dans certaines concessions est la juxtaposition d'habitations en paille et en ciment ou banco. Cela suppose probablement le choix de 2 stratégies séparées (MIILD et PID) pour la même concession.

2-2-2-Conclusion

L'étude a révélé que les populations ont une bonne connaissance des mesures préventives contre les moustiques, mais la mise en œuvre d'un programme de sensibilisation est nécessaire sur la cause du paludisme. Malgré la diversité des outils de prévention contre les piqûres de moustiques, les moustiquaires sont les plus utilisées. L'adhésion à la mise en œuvre d'une stratégie de lutte basée sur les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides est totale : 98,70 % des personnes interrogées sont favorables à la campagne et acceptent d'y participer. Une frange importante des habitations offrent les conditions d'une pulvérisation intradomiciliaire. Plus de la moitié des murs sont en ciment crépis offrant des surfaces lisses traitables. Il en est de même des murs en terre de barre. Toutefois, nous suggérons la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action pour les populations dont les maisons ne remplissent pas les conditions d'une pulvérisation intradomiciliaire. Par ailleurs, lors de la mise en œuvre de la stratégie, il est important de prendre en compte les aspects culturels comme les coutumes et les tabous des populations. Minimiser les croyances des populations pourrait faire naître une révolte néfaste à l'adhésion.

3- Evaluation entomologique du paludisme en prélude à une campagne de pulvérisation intradomiciliaire dans le département de l'Ouémé au Bénin.

Une étude entomologique de base a été réalisée avant la mise en œuvre de la PID dans les quatre communes. Des captures de nuit sur homme et dans les pièges-fenêtres ont permis de déterminer le comportement des moustiques dans la zone d'étude et le niveau de transmission du paludisme avant le traitement des maisons. Des prospections larvaires ont également permis de réaliser des tests de sensibilité et de déterminer le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides. Les données entomologiques obtenues avant la PID ont été comparées à celles enregistrées après l'intervention afin d'évaluer l'efficacité de la stratégie et de partager les acquis avec les PNLP pour le développement d'une meilleure stratégie de gestion de la résistance afin de vaincre le paludisme.

3-1-Résultats

Les données relatives à la zone témoin n'ont pas été présentées ici. Elles seront utilisées pour une comparaison avant et après les interventions, dans le cadre des études de l'impact des interventions.

3-1-1-Espèces de moustiques rencontrées

La faune culicidienne agressive pour l'homme a été diversifiée dans chacune des 4 communes d'intervention. Les récoltes des moustiques par pièges fenêtres, après aspersion d'une bombe insecticide non rémanant à l'intérieur des maisons et par capture sur homme ont permis d'identifier 14 espèces de *Culicidés*, dont 4 sont du genre *Anopheles*, 5 du genre *Culex*, 3 du genre *Aedes* et 2 du genre *Mansonia* (tableau XIII). Cette faune culicidienne a été présente durant les saisons sèche et pluvieuse et dans toutes les localités. Toutefois sa composition et sa densité sont variables. Le total des culicidés capturés a été de 49059, dont 38051 culicinés, soit 77,56 % essentiellement représentés par les espèces *Mansonia africana*, *Culex nebulosus*, *Cx decens* et *Cx quinquefasciatus*. Quant à la faune anophélienne, elle a été essentiellement constituée par l'espèce *An. gambiae s.l* représentant 20,91 % de l'ensemble des captures de culicidés alors que *An. funestus* n'a représenté que 0,007%. Les espèces *An. pharoensis*, *An. ziemanni* et *An. coustani*, sont quant à elles présentes à des pourcentages très faibles. *An. pharoensis* a été présent dans toutes les localités (tableau XIII) durant la saison pluvieuse et la saison sèche, alors que *An. ziemanni* n'a été rencontré qu'à Dangbo (saison pluvieuse et saison sèche) et à Sèmè (saison pluvieuse). *An. coustani* a été récolté en saison sèche à Dangbo et Sèmè, mais seulement à Adjohoun en saison pluvieuse.

Table XIII: Diversité des espèces de moustiques rencontrées à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè, durant la saison sèche (janvier à mars) et la saison pluvieuse (avril à juillet) pour deux séances de capture par mois

Species	Adjohoun			Dangbo			Missérété			Sèmè			General Total		
	Ef Tot	Ef Ss	Ef Sp	Ef Tot	Ef Ss	Ef Sp	Ef Tot	Ef Ss	Ef Sp	Ef Tot	Ef Ss	Ef Sp	Ef Tot	Ef Ss	Ef Sp
<i>Anopheles gambiae</i>	1343	124	1219	2398	432	1966	1612	198	1414	4906	388	4518	10259	1142	9117
<i>Anopheles funestus</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	3	0	3
<i>Anopheles pharoensis</i>	197	73	124	456	337	119	13	6	7	53	14	39	719	430	289
<i>Anopheles ziemanni</i>	0	0	0	13	9	4	0	0	0	5	0	5	18	9	9
<i>Anopheles coustani</i>	1	0	1	3	3	0	0	0	0	5	5	0	9	8	1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	608	238	370	1617	781	836	410	14	396	547	342	205	3182	1375	1807
<i>Culex decens</i>	180	30	150	1991	187	1804	232	13	219	2514	874	1640	4917	1104	3813
<i>Culex nebulosus</i>	903	197	706	1517	100	1417	1306	0	1306	1715	1178	537	5441	1475	3966
<i>Culex thalassius</i>	88	0	88	54	41	13	0	0	0	0	0	0	142	41	101
<i>Culex fatigans</i>	0	0	0	0	0	0	7	0	7	0	0	0	7	0	7
<i>Aedes aegypti</i>	33	18	15	64	20	44	61	25	36	11	4	7	169	67	102
<i>Aedes palpalis</i>	16	1	15	16	0	16	111	3	108	0	0	0	143	4	139
<i>Mansonia africana</i>	9757	7353	2404	10418	7603	2815	1517	1065	452	2335	1793	542	24027	17814	6213
<i>Mansonia uniformris</i>	7	5	2	5	3	2	3	1	2	8	3	5	23	12	11
General total	13134	8039	5095	18553	9516	9037	5273	1325	3948	12099	4601	7498	49059	23481	25578

Ef Tot: Effectif Total; Ef Ss: Effectif de la saison sèche; Ef Sp : Effectif de la saison pluvieuse

3-1-2-Densité vectorielle et dynamique des populations

Nous n'avons capturé que très peu de *An. funestus*. Seul *An. gambiae* a été pris en compte.

3-1-2-1- Densités moyennes au repos dans les habitations humaines et par piège fenêtre

Dans les chambres à coucher un total de 783 femelles de *An. gambiae* au repos ont été récoltées. La densité moyenne au repos a été de 4,07 FCJ (Nombre de femelles /Chambre/Jour) pour l'ensemble de la zone d'étude (tableau XIV), avec des variations d'une localité à l'autre ($\chi^2 = 30,92$; df = 7 ; p = 0). Les plus fortes densités ont été observées à Sèmè plateau (10,42 FCJ) et à Missérétré périphérique (8,75 FCJ) et sont significativement différentes (P<0,05).

Concernant la technique d'échantillonnage par piège fenêtre, la densité moyenne par piège fenêtre a été de 2,12 (FPJ) (Nombre de femelles / Piège fenêtre/Jour) (tableau XIV). Le nombre de femelles par piège et par jour a subi des variations selon la localité ($\chi^2 = 29,18$; df = 7 ; p = 0,00). Il a été respectivement de 5,75 FPJ et 3,25 FPJ dans les localités de Sèmè plateau et Missérétré périphérique où nous observons de nouveau les plus fortes valeurs comme pour la densité au repos. La densité la plus faible (1,08) a été enregistrée à Adjohoun plateau.

Lorsqu'on a comparé la zone du plateau en général avec celle de la périphérie, la variation de la densité au repos n'est plus significative ($\chi^2 = 0,67$; df = 1 ; p = 0,41) (tableau XIV). Il a été de même pour la densité par piège ($\chi^2 = 0,27$; df = 1 ; p = 0,60) (tableau XIV).

Tableau XIV: Densités des femelles de *An. gambiae* au repos dans les habitations humaines et densités par pièges fenêtres selon les localités et les zones écologiques.

Localités et zones écologiques	Effectif total des anophèles capturés par aspersion	Effectif total des anophèles capturés par piège fenêtre	Nombre de cases. jours de capture	Femelles/case /jour	Femelle /piège/jour
Adjohoun plateau	58	26	24	2,42 ^a	1,08 ^a
Dangbo plateau	53	31	24	2,21 ^a	1,29 ^{ab}
Missérété plateau	52	32	24	2,17 ^a	1,33 ^a
Sèmè plateau	250	138	24	10,42 ^c	5,75 ^{ac}
Zone du plateau	413	227	96	4,30^a	2,36^a
Adjohoun périphérique	55	36	24	2,29 ^a	1,50 ^a
Dangbo périphérique	50	32	24	2,08 ^a	1,33 ^{ad}
Missérété périphérique	210	78	24	8,75 ^b	3,25 ^a
Sèmè périphérique	55	35	24	2,29 ^a	1,46 ^a
Zone périphérique	370	181	96	3,85^a	1,08^a
Total	783	408	192	4,07	2,12

3-1-2-2- Comportement endophile et taux de gorgement

Moins de 40% des *An. gambiae* qui vont à l'intérieur des chambres prendre leur repas ressortent, ce qui indique un degré d'endophilie relativement élevé (tableau XV). Cette endophilie est un facteur favorable pour la réalisation de la pulvérisation intradomiciliaire. Le degré d'endophilie relativement élevé qui caractérise *An. gambiae* dans l'Ouémé a été constaté dans toutes les localités. La comparaison des différents taux n'a révélé aucune différence significative ($\chi^2 = 11,12$; df = 7 ; p = 0,13). Sur le total de 1191 femelles *An. gambiae* capturées par spray et par piège fenêtre, 634 ont été trouvées gorgées soit 53,23% et 462 gravides, soit 38,79 % (tableau XV). Le taux de gorgement n'a pas été le même dans toutes les localités ($\chi^2 = 27,77$; df = 7 ; p = 0,00). Ce taux est globalement moins bas dans les zones du plateau (52,38% à Adjohoun) comparativement à celles de la périphérie (66,66% à Adjohoun) (tableau XV).

Tableau XV: Etat physiologique de l'abdomen des femelles de *An. gambiae* récoltées dans les maisons et leur degré d'endophilie.

Localités	Effectif analysé	Nbre captures par spray	Nbre de gravides	Nbre de gorgés	Paramètres					
					Moy	Taux d'endophilie %	Moy	Taux de gravidité %	Moy	Taux de gorgement %
					[95 %CI]					[95 %CI]
Adjohoun plateau	84	58	26	44	69,45 ^a	[59,07-79,82]	30,75 ^a	[24,09-37,40]	52,38 ^{ab}	[50,37-53,62]
Dangbo plateau	84	53	31	46	63,86 ^a	[51,98-75,73]	36,59 ^{ab}	[33,91-39,27]	54,33 ^{ab}	[50,36-58,29]
Missérété plateau	84	52	29	43	62,12 ^a	[53,33-70,91]	34,19 ^{ab}	[30,43-37,94]	50,66 ^a	[44,85-56,47]
Sèmè plateau	388	250	142	151	64,38 ^a	[57,59-71,16]	36,60 ^{ab}	[29,66-43,54]	54,33 ^a	[43,74-64,92]
Adjohoun périphérique	91	55	41	61	60,94 ^a	[52,48-69,40]	44,72 ^{cd}	[41,44-47,99]	66,66 ^{cd}	[61,89-71,43]
Dangbo périphérique	82	50	38	57	61,87 ^a	[55,25-68,50]	46,93 ^d	[41,43-52,43]	70,16 ^d	[62,05-78,27]
Missérété périphérique	288	210	120	180	73,30 ^a	[66,95-79,64]	41,83 ^{bcd}	[39,00-44,66]	62,16 ^{bcd}	[58,10-66,22]
Sèmè périphérique	90	55	35	52	61,38 ^a	[52,19-70,57]	39,02 ^{cd}	[32,81-45,22]	58,33 ^{abc}	[49,19-67,47]
Total	1191	783	462	634	65,74	[62,12-67,20]	38,79	[36,86-40,79]	53,23	[55,99-61,17]

C I : 95% Intervalle de confiance ; Nbre: Nombre; Moy: Moyenne. Les valeurs qui portent en exposant les lettres différentes sont significativement différentes ($p<0,05$).

3-1-2-3- Densité agressive moyenne et fluctuations saisonnières du taux d'endophagie selon les localités

Après 896 séances de capture de nuit sur homme un total de 9068 anophèles ont été récoltées. La densité agressive moyenne sur homme estimée à partir du nombre de piqûres par homme et par nuit (PHN) a été de 10,12 (tableau XVI) pour l'ensemble de la zone d'étude. En considérant chaque localité, cette densité agressive moyenne a été de 2,43 ; 2,93 ; 9,86 et 24,43 piqûres/homme/nuit, respectivement à Adjohoun plateau, Dangbo plateau, Missérétré périphérique et Sèmè périphérique. Elle a donc varié selon les localités ($\chi^2 = 20,33$; df = 7 ; p = 0,00), mais a été comparable entre Adjohoun plateau, Dangbo plateau et Missérétré plateau (tableau XVI). En considérant la zone du plateau en général la densité agressive a été significativement différente de celle de la zone périphérique ($\chi^2 = 11,10$; df = 1 ; p = 0,00) (tableau XVI). Quant au taux d'endophagie, il a été estimé à 70,18%, c'est-à-dire globalement 3 moustiques sur 4 préfèrent prendre leur repas à l'intérieur des maisons. Ce degré d'endophagie assez élevé a été compris entre 60,94% (Adjohoun périphérique) et 73,30% (Missérétré périphérique). De façon globale la comparaison des différents taux d'endophagie n'a révélé aucune différence significative ($\chi^2 = 9,064$; df = 7 ; p = 0,24). Le fort taux d'endophagie noté dans la zone d'étude nécessite la mise en place d'une stratégie de prévention contre l'agressivité des moustiques à l'intérieur des maisons, en l'occurrence les moustiquaires imprégnées ou la PID que préconise le PNLP. Par ailleurs l'agressivité du moustique à l'intérieur obéit à une variation saisonnière ($\chi^2 = 15,35$; df = 1 ; p = 0,00) et à une variation selon la zone écologique ($\chi^2 = 7,42$; df = 1 ; p = 0,00). D'après la figure 32, cette activité aggressive à l'intérieur a été plus forte en saison pluvieuse qu'en saison sèche, avec le maximum en mai pour les localités périphériques et en Juin pour les localités urbaines.

Tableau XVI: Densités agressives moyennes et taux d'endophagie des femelles de *An.gambiae* capturées selon les localités et les zones écologiques

Localités	Effectif total des anophèles capturés	Nombre de captureurs et de nuits de capture	Piqûre/Homme/Nuit	Effectif capturé à l'intérieur	Endophagie %
Adjohoun plateau	272	112	2,43 ^a	200	73,52 ^a
Dangbo plateau	328	112	2,93 ^a	261	79,57 ^a
Missérété plateau	136	112	1,21 ^a	88	64,70 ^a
Sèmè plateau	1692	112	15,11 ^{ab}	1080	63,82 ^a
Zone du plateau	2428	448	5,42^a	1629	67,09^a
Adjohoun périphérique	896	112	8 ^{ab}	592	66,07 ^a
Dangbo périphérique	1904	112	17 ^{ab}	1375	72,21 ^a
Missérété périphérique	1104	112	9,86 ^{ab}	660	59,78 ^a
Sèmè périphérique	2736	112	24,43 ^b	2108	77,04 ^a
Zone périphérique	6640	448	14,82^b	4735	71,31^a
Total	9068	896	10,12	6364	70,18

Les valeurs qui portent en exposant les lettres différentes sont significativement différentes ($p<0,05$).

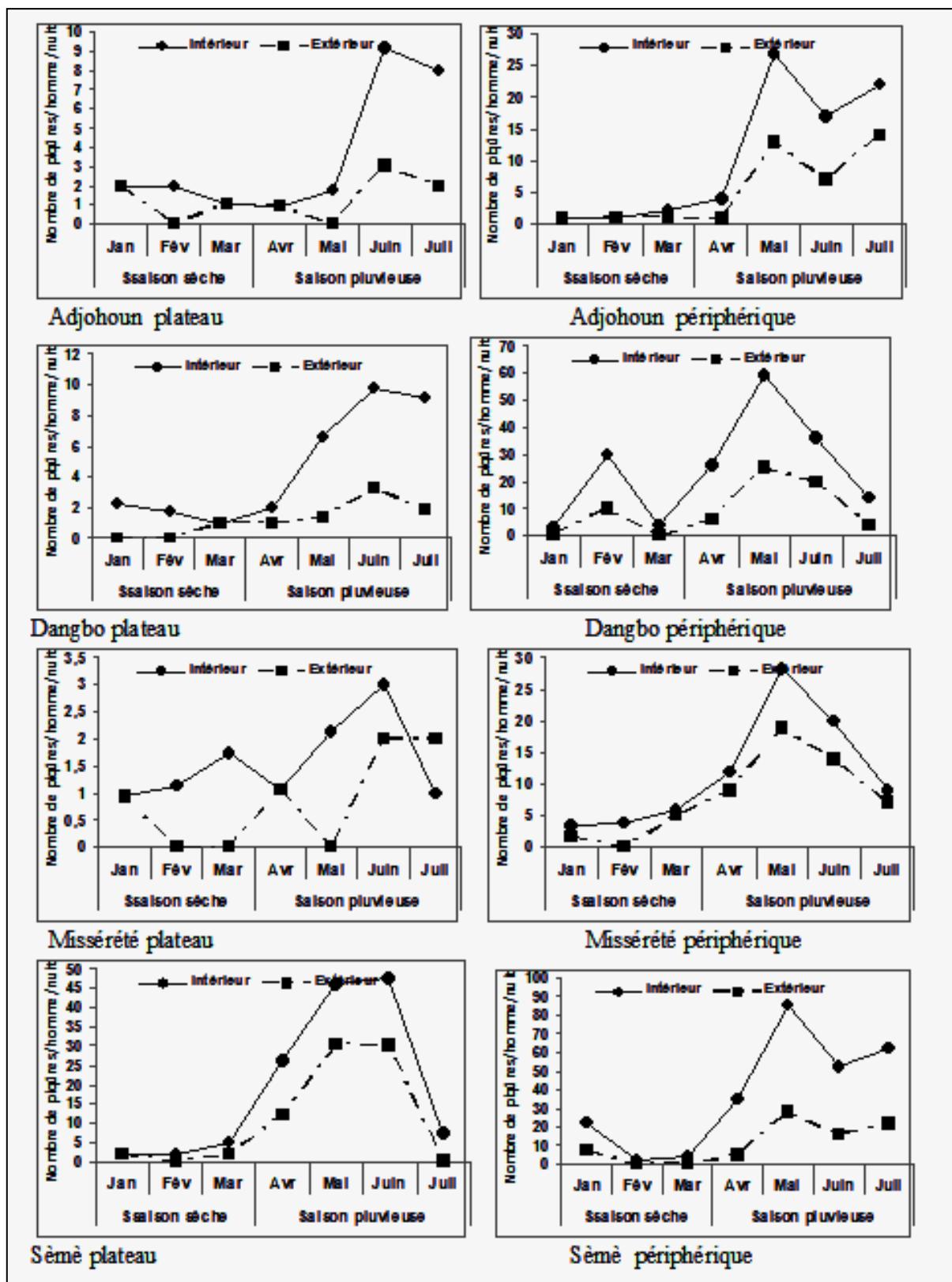


Figure 32: Variations saisonnières de la densité agressive des femelles de *An.gambiae* capturées à l'intérieur et à l'extérieur par localité

3-1-3-Age physiologique et infectivité de *An. gambiae*

Le taux de parturité moyen a été de 77,10% (1414 pares sur 1834 femelles disséquées) avec des variations d'une localité à une autre. C'est à Sèmè en milieu périphérique que ce taux a paru plus élevé (80,06 %) et comparable ($p>0,05$) avec les autres localités (tableau XVII), alors qu'à Adjohoun périphérique le taux a été plus faible ($p<0,05$). Il n'y a pas eu de variation saisonnière de la longévité ($p>0,05$).

L'analyse des *An. gambiae* récoltés à l'ELISA-CSP, a révélé 31 *An. gambiae* femelles positives pour un total de 1394 femelles analysées, soit un indice moyen d'infection de 2,22%. Le nombre de piqûres infectantes de *An. gambiae* reçues par homme et par nuit est indiqué dans le tableau XVII. Le taux d'inoculation entomologique (EIR) a varié de 0,07 à 0,73 piqûres infectantes par homme et par nuit dans l'ensemble de la zone d'étude. En projetant ce taux sur l'ensemble de la période d'étude, un homme reçoit théoriquement entre 14,7 et 153,3 piqûres infectées entre janvier et juillet, c'est-à-dire en 7 mois. Toutefois, à Sèmè (94,5 piqûres infectantes à 153,3 piqûres infectantes) et à la périphérie de Adjohoun (100,8 piqûres infectantes), les taux d'inoculation à l'intérieur des maisons sont nettement plus élevés. Les infections ont été obtenues pour la plupart entre avril et juillet pendant la saison pluvieuse. En effet, entre janvier et mars (saison sèche) le taux d'inoculation est nul sauf à Sèmè où un homme recevait 3,6 piqûres infectées pour l'ensemble des 3 mois.

Tableau XVII: Taux de parturé et taux d' inoculation entomologique de *An. gambiae* collecté par la capture sur homme dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè (Janvier à Juillet 2008).

		Saison sèche		Saison pluvieuse		Janvier à Juillet 2008	
		Janvier à Mars 2008		Avril à Juillet 2008			
Adjohoun plateau	Effectif total	65		207		272	
	Parturé %	81,67 ^a	[74,08-89,26]	77,25 ^a	[71,68-82,82]	79,41^b	[75,74-83,07]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	1,35		3,23		2,43	
	N testé par ELISA	58		70		128	
	S%	0		5,71		3,12	
	TIE(pi/h/n)	0		0,18		0,07	
	Effectif total	48		280		328	
	Parturé %	84,67 ^a	[70,99-98,35]	75,75 ^a	[60,25-91,25]	79,87^b	[71,39 -88,34]
Dangbo plateau	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	1		4,375		2,93	
	N testé par ELISA	48		89		137	
	S%	2,08		4,49		3,64	
	TIE(pi/h/n)	0,02		0,19		0,1	
	Effectif total	38		98		136	
	Parturé %	76 ^a	[73,52-78,48]	66 ^a	[54,31-77,69]	70,58^{ab}	[63,56 -77,59]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	0,79		1,53		1,21	
Missérété plateau	N testé par ELISA	38		78		116	
	S%	0		0		0	
	TIE(pi/h/n)	0		0		0	
	Effectif total	100		1592		1692	
	Parturé %	84,67 ^a	[78,42-90,92]	76,25 ^a	[68,63-83,87]	80^b	[74,49 -85,50]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	2,08		24,88		15,11	
	N testé par ELISA	52		114		166	
	S%	1,92		3,5		3,01	
Adjohoun périphérique	TIE(pi/h/n)	0,04		0,87		0,45	
	Effectif total	59		837		896	
	Parturé %	69,67 ^a	[65,87-73,46]	67 ^a	[61,34-72,66]	68,18^a	[65,37 - 70,98]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	1,23		13,08		8	
	N testé par ELISA	59		170		229	
	S%	0		1,17		0,87	
	TIE(pi/h/n)	0		0,15		0,07	
Dangbo périphérique	Effectif total	384		1520		1904	
	Parturé %	76,33 ^a	[64,08-88,59]	71,25 ^a	[61,49-81,01]	73,77^{ab}	[68,31 - 79,22]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	8		23,75		17	
	N testé par ELISA	109		170		279	
	S%	0		4,7		2,86	
	TIE(pi/h/n)	0		1,11		0,48	
Missérété périphérique	Effectif total	160		944		1104	
	Parturé %	75,67 ^a	[70,50-80,84]	74,75 ^a	[58,30-91,20]	75,2^{ab}	[68,33 -82,06]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	3,33		14,75		9,86	
	N testé par ELISA	46		93		139	
	S%	0		1,07		0,71	
	TIE(pi/h/n)	0		0,15		0,07	
Sèmè périphérique	Effectif total	288		2448		2736	
	Parturé %	83 ^a	[74,04-91,96]	77,75 ^a	[69,49-86,01]	80,06^b	[75,29 - 84,82]
	Homme. Nuits de capture	48		64		112	
	P/H/N	6		38,25		24,43	
	N testé par ELISA	76		124		200	
	S%	0		4,83		3	
	TIE(pi/h/n)	0		1,84		0,73	

P/H/N: Piqûre par homme et par nuit; N testé par ELISA: Nombre testé par ELISA; S%: Indice sporozoïtique; TIE(pi/h/n): Taux d'inoculation entomologique (piqûres infectantes par homme et par nuit); pour un même paramètre du tableau, les valeurs de la saison pluvieuse et de la saison sèche qui ont des lettres différentes en exposant sont significativement différentes ($p<0,05$) ; dans la colonne de Janvier à Juillet 2008, pour un même paramètre du tableau, les valeurs qui ont des lettres différentes en exposant sont significativement différentes ($p<0,05$) d'une localité à une autre.

3-1-4-Résultats des tests de sensibilité et de caractérisation moléculaire chez *An. gambiae*

Avant la mise en œuvre de la PID, nous avons étudié la sensibilité de *An. gambiae* pour noter le niveau de résistance de départ. Le but est de suivre le niveau de résistance après la campagne de pulvérisation et suivre l'évolution du phénomène. Dans chaque commune 200 femelles de *An gambiae* ont été exposées aux papiers imprégnés d'insecticide (tableau XVIII). Globalement, *An. gambiae* a développé une forte résistance à la perméthrine et au DDT. Selon les recommandations de l'OMS, toute population de *An. gambiae* présentant un taux de mortalité inférieur ou égal à 80% après exposition de 60 min, à des papiers imprégnés d'insecticide est considérée comme résistante. Or, dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérétré et Sèmè, à peine 1 moustique sur 2 meurt au contact de la perméthrine. Face au DDT, la résistance est plus forte (à peine 1 moustique sur 4 meurt). En revanche, vis-à-vis du bendiocarb, la sensibilité est très bonne : 100 % des anophèles testés sont morts (tableau XVIII). L'analyse PCR a révélé que 100% des anophèles testés sont des *An. gambiae s.s* de forme M, avec une fréquence *kdr* élevée (72,72% à 99%) (tableau XIX). La figure 33 a indiqué une corrélation très forte de coefficient $R^2 = 0,96$ entre le taux de mortalité obtenu avec les populations de *An. gambiae s.l* testés à la perméthrine et la fréquence *kdr*.

Tableau XVIII: Taux de mortalité de *An. gambiae* observé après 1heure d'exposition aux insecticides : perméthrine (0.75%), bendiocarb (0.1%), DDT (4%) et deltaméthrine (0.05%) dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè de Janvier à Juillet 2008.

Localités	Perméthrine					DDT					Deltaméthrine			Bendiocarb		
	% Mortalité					% Mortalité										
	Effectif testé	Moy	[95 % CI]	Statut	Effectif testé	Moy	[95 % CI]	Statut	Effectif testé	% Mortalité	Statut	Effectif testé	% Mortalité	Statut		
Adjohoun plateau	100	60,00 ^b	[54,80- 65,20]	R	100	32,00 ^b	[26,80-37,20]	R	100	100	S	100	100	S		
Dangbo plateau	100	54,00 ^{ab}	[45,78- 62,22]	R	100	20,00 ^a	[14,80- 25,20]	R	100	100	S	100	100	S		
Missérété plateau	100	49,00 ^a	[42,91- 55,09]	R	100	22,00 ^{ab}	[13,78- 30,22]	R	100	100	S	100	100	S		
Sèmè plateau	100	47,00 ^a	[40,91- 53,09]	R	100	19,00 ^a	[12,91- 25,09]	R	100	100	S	100	100	S		
Adjohoun périphérique	100	75,00 ^c	[68,91- 81,09]	R	100	30,00 ^b	[21,78- 38,22]	R	100	100	S	100	100	S		
Dangbo périphérique	100	59,00 ^b	[52,91- 65,09]	R	100	23,00 ^{ab}	[13,45- 32,55]	R	100	100	S	100	100	S		
Missérété périphérique	100	58,00 ^b	[49,78- 66,22]	R	100	26,00 ^{ab}	[17,78- 34,22]	R	100	100	S	100	100	S		
Sèmè périphérique	100	54,00 ^{ab}	[45,78- 62,22]	R	100	25,00 ^{ab}	[18,91- 31,09]	R	100	100	S	100	100	S		
Total	800	57		R	800	24,62		R	800	100	S	800	100	S		

C I : 95% Intervalle de confiance ; Pour un même paramètre du tableau les valeurs qui ont des lettres différentes en exposant sont significativement différentes ($p<0,05$).

Tableau XIX: Espèces, formes moléculaires, fréquences *kdr* et *ace-1^R*, allèles et génotypes de *An. gambiae s.l.* collecté dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè de Janvier à Juillet 2008.

Localités	Espèce <i>Anopheles gambiae s.s</i>	Forme moléculaire	Mutation <i>kdr</i>				Mutation <i>ace-1^R</i>			
			M	RR	RS	SS	F (<i>kdr</i>)	RR	RS	SS
Adjohoun plateau	22	22	14	4	4	72,72	0	0	22	0
Dangbo plateau	26	26	19	5	2	82,69	0	0	26	0
Missérété plateau	25	25	22	3	0	94	0	0	25	0
Sèmè plateau	50	50	49	1	0	99	0	0	50	0
Adjohoun périphérique	52	52	14	30	8	55,78	0	0	52	0
Dangbo périphérique	62	62	33	27	2	75	0	0	62	0
Missérété périphérique	64	64	36	28	0	78,12	0	0	64	0
Sèmè périphérique	72	72	60	0	12	83,33	0	0	72	0

F (*kdr*) : fréquence *kdr* ; F (*ace-1^R*) : fréquence *ace-1^R*

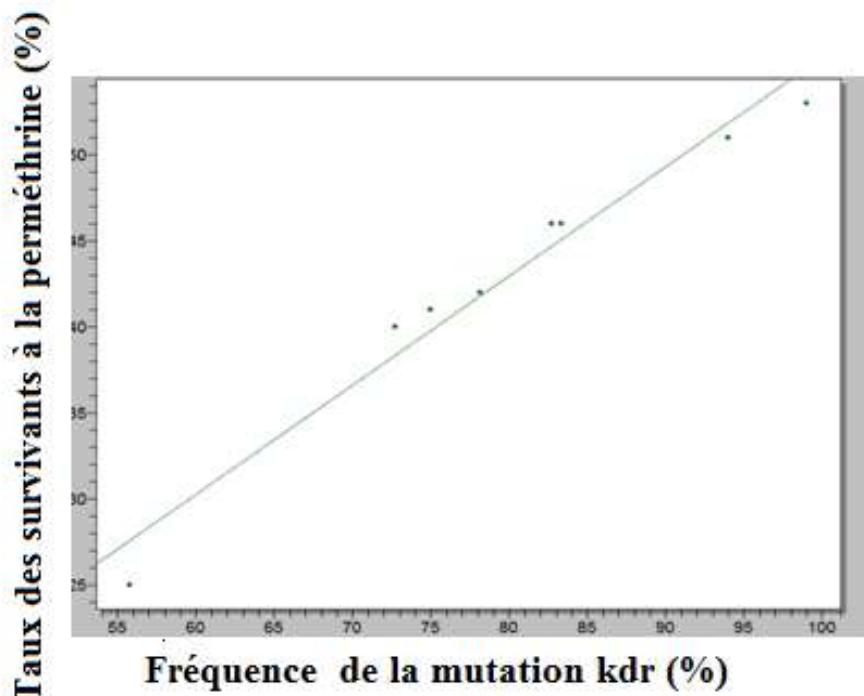


Figure 33: Corrélation entre la mutation *kdr* et les survivants à la perméthrine

3-2-Discussion et conclusion

3-2-1-Discussion

Avant la mise en œuvre de la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dans le département de l'Ouémé, une évaluation entomologique était nécessaire pour fournir des données de base sur la dynamique de transmission du paludisme et son intensité de départ. La récolte des moustiques a permis d'identifier les espèces de moustiques présentes dans les 4 communes avant la campagne de pulvérisation. Nous avons récolté 14 espèces de Culicidés, dont 4 sont du genre Anopheles, 5 du genre Culex, 3 du genre Aedes et 2 du genre Mansonia. Dans les localités de Cotonou et Porto-Novo proches des 4 communes, Huttel (1950) et Hamon (1954) avaient identifié les mêmes espèces dans des proportions variées, mais sans signaler la présence de *Cx fatigans*, *Cx quinquefasciatus* et *Aedes palpalis*. Akogbéto (1992), a signalé 8 espèces au sud du Bénin dont *Mansonia sp* , *An. gambiae s.l.*, *Cx thalassius* et *Cx. gr. decens*. Le même auteur avait aussi montré que *An. gambiae s.l.* est plus abondant en zone périphérique de Cotonou par rapport au centre urbain. Cette situation est similaire à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè où l'essentiel des culicidés capturés est représenté par les espèces *M. africana* (48,98 %), *An. gambiae s.l.* (20,91 %), *Cx. nebulosus* (11,09 %), *Cx. decens* (10,02 %) et *Cx. quinquefasciatus* (6,49 %). Par ailleurs, les travaux de Djénontin *et al.*, (2010) qui portent sur des localités au sud ouest du Bénin ont révélé 28 différentes espèces de culicidés dont *M. africana*, *Cx gr. decens* , *Cx quinquefasciatus* ,*Cx nebulosus*, *An. nili*, *An. funestus s.s.*, et *An. leesonii*. La variabilité dans la diversité écologique notée par les différents auteurs repose probablement sur les techniques d'échantillonnage utilisées, les périodes d'études, la zone d'étude et la dynamique des populations de moustiques sous les pressions extérieures.

La présence de *An. gambiae s.l* dans toutes les localités durant la saison pluvieuse et la saison sèche est liée à la présence permanente et à la multitude des petites collections d'eaux naturelles (pluies et cours d'eau) bien ensoleillées et oxygénées, non ou peu polluées (empreintes de sabots, excavations diverses, ornières). En revanche, la très faible présence de *An. funestus* dans les localités de Adjohoun, Dangbo et Missérété est en relation avec la richesse du sol en matières organiques et les activités anthropiques qui polluent les gîtes et les rend peu favorables à sa multiplication. Son absence totale à Sèmè s'explique par la salinité du sol sableux du fait de la proximité de la mer. Contrairement, dans les localités de Ouidah, Kpomassè et Tori, au sud ouest du Bénin , Djénontin *et al* ., (2010) avait capturé un total de

579 *An. funestus* dont 314 à l'intérieur des cases et 265 à l'extérieur, dans les villages caractérisés par la présence de rivière avec végétation et situés à moins de 2km du lac Toho.

C'est dire que dans la zone où Djénontin a fait son étude, les conditions de développement de *An. funestus* étaient réunies.

La forte tendance à l'endophilie des femelles de *An. gambiae* constatée dans toutes les localités, pourrait se justifier par plusieurs facteurs dont la rareté des abris extérieurs et la proximité des lieux de ponte de la zone d'habitation. En effet, les maisons des populations sont bâties sur un sol de nature argileuse favorable à la création de nombreux gîtes préférentiels de *An. gambiae* durant les périodes pluvieuses. De plus la zone d'étude est caractérisée par une forte proportion de maisons traditionnelles en banco, en bambous et de maisons modernes en ciment avec des toits de chaume qui constituent des lieux de repos préférentiels pour *An. gambiae* (Padonou et al ., 2011). Par ailleurs, les maisons sont munies de larges ouvertures entre les toits et les murs, favorisant l'entrée et la sortie des moustiques dans les chambres (Padonou et al ., 2011). Cette facilité offerte aux moustiques pour pénétrer dans les habitations auxquelles s'ajoutent la juxtaposition des cases du fait du mode de vie communautaire et le nombre élevé de personnes dormant par case (Padonou et al ., 2011) explique la forte endophilie de *An. gambiae* (Mouchet, 1957) et sa facilité de prise de repas de sang. Le choix des maisons comme lieu de repos par les anophèles est un facteur favorable pour la réalisation de la pulvérisation intradomiciliaire. Ces observations montrent que le choix effectué par le PNLP de réaliser la pulvérisation intradomiciliaire est en accord avec le comportement du vecteur.

Par ailleurs, le comportement de *An. gambiae* à se nourrir sur l'homme préférentiellement à l'intérieur des maisons, se justifie par le fait que les populations ne se couchent pas à l'extérieur des cases dans la zone d'étude. En conséquence, *An. gambiae* a peu de chance de se nourrir à l'extérieur. C'est cela qui justifie les fortes densités agressives à l'intérieur et au repos dans les habitations. Toutefois, la variation spatiale des densités de *An. gambiae* constatée dans les zones périphérique et du plateau est en relation avec les caractéristiques écologiques des deux zones marquées par des variations saisonnières qui influencent la dynamique de la population culicidienne. En zone de plateau, les premières pluies créent des gîtes temporaires d'eaux claires superficielles, sans végétation rapidement colonisés par *An. gambiae*. Ce vecteur se développe uniquement pendant la saison des pluies. Or, dans les zones marécageuses les conditions sont favorables à la création de gîtes semi-permanents ou permanents pour les moustiques. En effet, la présence des marécages, les activités champêtres et la structure argileuse du sol, prolongent la durée des gîtes créés jusqu'en saison sèche. A

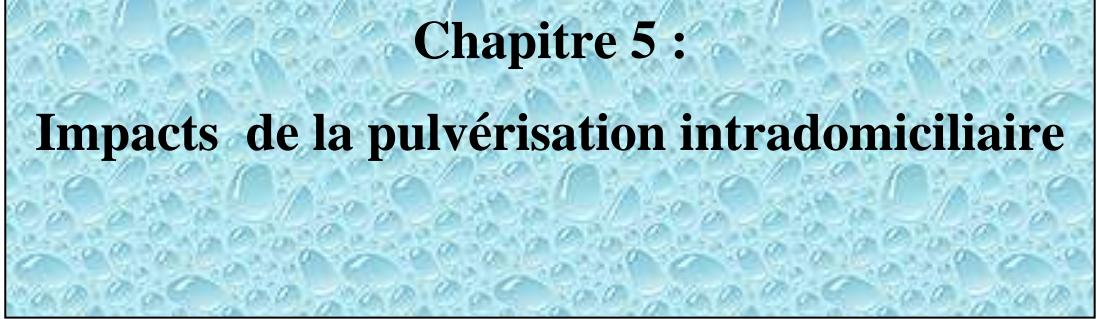
cette dynamique s'ajoute la décrue (novembre à décembre), qui est accompagnée à son tour de petites poches d'eau ça et là favorables au développement de *M. africana*, des *Culex sp* et de *An.gambiae*. C'est ce qui explique qu'en saison sèche (Janvier, février, mars) l'on a capturé plus de culicidés (Adjohoun : 61,20% ; Dangbo : 51,29%) qu'en saison pluvieuse (Avril, mai, juin, juillet) (Adjohoun : 38,8% ; Dangbo : 48,71%). Par contre, à Sèmè la forte activité agressive de *An.gambiae* observée à l'intérieur des cases en saison pluvieuse avec un PHN élevé, se justifie par la présence d'une plaine marécageuse, à relief assez plat et une nappe phréatique peu profonde qui favorise l'inondation une période de l'année. La conséquence est la formation de nombreuses flaques d'eau favorables à la reproduction rapide des moustiques. Cette situation associée à la structure des habitations munies de voies d'accès pour les moustiques et aux comportements des hommes qui ne dorment qu'occasionnellement sous moustiquaires pourrait aussi justifier le taux élevé de parturité constaté durant toute la période d'étude et dans toutes les localités. Pour cette raison, il est souhaitable que les pulvérisations se déroulent en début de saison pluvieuse. En effet, durant la période sèche le TIE a varié entre 0 et 3,6 (janvier à mars) piqûres infectantes par homme alors que durant la saison pluvieuse (avril à juillet) il a varié entre 21,6 à 220,8 piqûres infectantes par homme. Pour l'ensemble de la période d'étude (Janvier à Juillet) les taux d'inoculation entomologique (TIE) estimés par extrapolation à 164.5, 175.2 et 266.45 piqûres infectantes par homme et par an, respectivement à Sèmè plateau, Dangbo périphérique et Sèmè périphérique sont élevés par rapport à ceux mentionnés par Akogbéto *et al.*, (1992) dans le sud du Bénin. Signalons que dans l'étude de Akogbéto, la détermination de l'indice sporozoïtique n'a pas été fait par l'analyse ELISA pour la présence de la protéine CS, mais a été basée sur la détection des glandes salivaires par microscopie qui indiquait des niveaux beaucoup plus bas de l'indice sporozoïtique. Toutefois les TIE élevés notés à Sèmè et Dangbo, sont similaires à ceux décrits à Gansé dans la zone de savane de Côte d'Ivoire (TIE = 410 piqûres infectantes par an) (Adja *et al.*, 2006) où *An. gambiae*, *An. funestus*. et *An. nili* ont été les trois vecteurs impliqués dans la transmission du paludisme et dans une zone de montagne à l'ouest du Cameroun où un homme reçoit 100,8 piqûres infectantes en moins d'un an (Atangana *et al.*, 2009). Les nombres de piqûres infectantes par homme et par an estimés à 25.55 (Adjohoun plateau, Adjohoun périphérique et Missérété périphérique), 36.5 (Dangbo plateau) et 0 (Missérété plateau) sont nettement plus faibles que les valeurs indiquées pour les zones similaires dans le sud du Bénin en 1990 (Akogbéto *et al.*, 1992). Ces nombres sont également faibles par rapport aux données enregistrées dans la ville de Bouaké (67,3 piqûres infectantes par année) (Dossou-yovo *et al.*, 1998). Ces bas niveaux du TIE sont

probablement dus à l'utilisation généralisée des serpentins et à la promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticides. Malgré ces faibles TIE, les pulvérisations intradomiciliaires sont nécessaires. Car un taux d'inoculation entomologique de 10 piqûres infectantes par homme et par an permet de maintenir une transmission normale du paludisme (Akogbéto, communication personnelle). La réalisation de la PID pourrait permettre de réduire de plus de 50% la transmission du paludisme comme cela a été lors des projets de pulvérisations intradomiciliaires réalisés entre les années 50 et 70 à Pare-Taveta et Zanzibar (Tanzanie), Kisumu (Kenya) et Garki (Nigéria) (Christopher F. Curtis, 2000). Récemment au Kenya la PID a réduit l'incidence du paludisme de 64,4% chez des enfants scolarisés dans une zone de vallée située à l'ouest (Zhou 2010). La stratégie de pulvérisation intradomiciliaire adoptée par le PNLP, lui permettrait probablement de réduire de façon significative la transmission du paludisme dans la mesure où une réduction de transmission de plus de 50 % dans l'Ouémé, permettrait de réduire le TIE à moins de 10 piqûres infectantes par homme et par an. Toutefois à Sèmè et Dangbo où les TIE sont particulièrement élevés il va falloir réaliser la PID sur plusieurs années pour avoir un impact.

Du point de vue forme moléculaire, l'analyse des données confirme que *An. gambiae* de forme M est le principal vecteur du paludisme dans les 4 communes. Cette absence de la forme moléculaire S confirme les résultats de Djogbénou et al., (2010). La forte fréquence *kdr* observée au sein de la population de *An. gambiae* confirme les travaux de Yadouléton et al.,(2010). La corrélation observée entre la fréquence de l'allèle *kdr* et le taux de survie à la perméthrine suggère que la substitution de type Leu1014Phe chez *An. gambiae* est le mécanisme contribuant fondamentalement à cette résistance (Ranson et al., 2000). La sélection de cette mutation se justifierait par le fait que la zone d'étude est à dominance agricole et soumise à une pression de sélection exercée par les pesticides utilisés par les paysans pour protéger leurs cultures (Akogbéto et al., 2005) . La promotion de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action encouragée par l'OMS au cours des années 2000, contribuerait aussi à cette pression de sélection des pesticides. L'absence de la résistance aux carbamates confirment les travaux réalisés en cases expérimentales par Akogbéto et al., (2010) . Toutefois, il est souhaitable que les études se poursuivent afin de suivre la dynamique de la résistance de *An. gambiae* aux carbamates, au cours et à la fin des campagnes de pulvérisation intradomiciliaire à base de bendiocarb.

3-2-2-Conclusion

Anopheles gambiae est le principal vecteur assurant la transmission du paludisme dans le département de l'Ouémé. Sur le plan moléculaire, il s'agit d'une espèce homogène composée exclusivement de la forme M. *An. funestus* intervient également dans la transmission, mais son rôle est infime car il est peu représenté. Dans les 4 communes, la situation écologique est favorable au maintien d'une densité importante de *An. gambiae* qui se gorge préférentiellement sur l'homme à l'intérieur des habitations où il se repose. Ce caractère endophage et endophile est très favorable à la stratégie que le Programme National de Lutte contre le Paludisme envisage de mettre en œuvre. De plus, *An. gambiae* est caractérisé par un taux de parturité élevé. En effet, ¾ des femelles disséquées sont trouvées pares quelle que soit la saison. La PID que propose le PNLP est par excellence la stratégie de choix pour limiter le nombre de *An. gambiae* pares et ainsi réduire leur infectivité vis-à-vis du Plasmodium. Dans la zone d'étude, *An. gambiae* a développé une forte résistance vis-à-vis des pyréthrinoïdes. Le choix de cette classe d'insecticides pour le traitement des maisons n'est pas souhaité. Une alternative possible est le bendiocarb vis-à-vis duquel nous avons noté une bonne sensibilité de *An. gambiae*. Au cas où ce produit est retenu il y a espoir que la transmission du paludisme soit réduite de façon drastique.



Chapitre 5 :

Impacts de la pulvérisation intradomiciliaire

1-Introduction

Face aux conséquences néfastes du paludisme, en particulier l'émergence des populations résistantes du principal vecteur *Anopheles gambiae* aux pyréthrinoïdes, l'une des solutions possibles est l'utilisation d'outils associés à d'autres classes d'insecticides. Les insecticides non pyréthrinoïdes et les répulsifs constituent actuellement l'une des alternatives. Suite à des travaux réalisés en cases expérimentales pour évaluer l'efficacité des organophosphorés et carbamates, (Asidi *et al.*, 2005 ; N'Guessan *et al* 2007b ; Akogbéto *et al.*, 2010), le bendiocarb a été choisi au Bénin pour être utilisé en pulvérisation intradomiciliaire (PID) à grande échelle dans le département de l'Ouémé, contre *An. gambiae* résistant aux pyréthrinoïdes. L'approche de lutte antivectorielle retenue par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) dans ce département repose sur deux méthodes : la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) de type Permanet 2.0 dans les zones inondables puis la PID à base de bendiocarb dans les zones non inondables. Les deux interventions ont démarré le 3 juillet 2008 et se sont poursuivies jusqu'en août 2010. En Afrique les PNLP ont généralement mis en œuvre des stratégies efficaces. Cependant, il est largement reconnu que le suivi-évaluation est une composante faible de nombreux programmes nationaux de lutte contre les maladies (Akogbéto *et al.*, 2011). Par conséquent, il est important de mener des travaux de recherche pour suivre l'efficacité de tout programme de lutte. La nécessité de ce suivi-évaluation est une priorité pour la communauté scientifique dont l'objectif à long terme est l'éradication du paludisme (Feachem et Philipps, 2009). C'est pour cela que cette troisième partie de la thèse a pour objectif d'évaluer l'impact de l'approche du PNLP sur la transmission du paludisme dans les communes concernées, afin d'envisager sa généralisation ou non. Pour atteindre cet objectif nos travaux ont été menés en comparant la situation entomologique observée dans les zones de PID et MIILD, avant et après chaque intervention de lutte. Par ailleurs une commune n'ayant bénéficié d'aucune intervention a servi de témoin. L'impact entomologique a été mesuré en étudiant les effets du bendiocarb en PID et de la couverture en Permanet 2.0 sur le comportement de *An.gambiae* dans le département de l'Ouémé au sud du Bénin (**Article 4**) et sur la transmission du paludisme (**Article 5**). Nous nous sommes également intéressés à la rémanence des insecticides sur les supports imprégnés (**Article 6**) et l'évolution de la résistance de *Anopheles gambiae* avant et après intervention (**Article 7**).

Article 4 : Padonou GG, Gbédjissi G, Yadouléton A, Aikpon R, Azondekon R, Oussou O Gnanguenon V, Martin Akogbéto. Decrease proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae* populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions (Soumis dans *Parasites & Vectors*).

Article 5 : Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Kinde DG, Gbedjissi GL (2011).

Dramatic Decrease in Malaria Transmission after Large-Scale Indoor Residual Spraying with Bendiocarb in Benin, an Area of High Resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(4): 586–593.

Article 6 : L'étude de la rémanence des insecticides sur les supports imprégnés (En cours de rédaction).

Article 7 : Padonou GG, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbéto M. Impact of three years of large scale of indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions on the insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.l.* in Benin. *Parasites & Vectors* 2012, 5:72

.

2-Effets du bendiocarb en PID et de la couverture en PermaNet 2.0 sur le comportement des populations de *Anopheles gambiae* résistant aux pyréthrinoïdes dans le département de l'Ouémé au sud du Bénin.

Les principaux vecteurs du paludisme au Bénin, *An. gambiae* et *An. funestus* se nourrissent presqu' exclusivement à l'intérieur des habitations durant la nuit sur l'homme (Lyimo et Ferguson, 2009). Les MIILDs et la PID sont les principaux outils de lutte antivectorielle utilisés par le PNLP pour protéger les populations contre les piqûres de moustiques à l'intérieur des habitations. L'impact de ces outils appliqués à grande échelle doit être évalué. C'est ce qui justifie la présente étude qui est une analyse comparative des comportements alimentaire, de repos et de survie des vecteurs du paludisme dans un environnement soumis aux effets des MIILDs et de la PID à grande échelle.

2-1-Résultats

2-1-1- Variation du taux d'entrée de *An. gambiae*.

Avant les interventions PID, 928 *An. gambiae* ont été récoltés au total par les pièges fenêtre de sortie et le spray matinal, dans les localités à Adjohoun, Dangbo, Missérétré₁ et Missérétré₂

et Sèmè. Mais après la PID, ce nombre est tombé à 89, soit une réduction de 90,40% pour l'ensemble des 4 communes. Cette réduction a été très importante, en particulier à Sèmè PID où aucun *An. gambiae* n'a été capturé (Tableau XX). En revanche dans la zone témoin nous avons noté une tendance inverse (Tableau XX) traduite par une augmentation de 50% du nombre de *An. gambiae*. Mais ce nombre est passé de 404 à 384, soit 4,95% dans le bras contrôle MILD (Tableau XX). Cette baisse n'a pas été uniforme dans la zone MIILD. Il y a eu une réduction de 20,88% à Adjohoun, contrairement à une augmentation dans les proportions respectives de 21,95% et 140% à Dangbo et Sèmè.

Tableau XX: Réduction du taux d'entrée de *An. gambiae* avant et après intervention dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè

Localités	Effectif de <i>An. gambiae</i> capturé avant intervention (Mai à Juillet 2008)	Effectif de <i>An. gambiae</i> capturé après intervention (Mai à Juillet 2009)	Réduction du taux d'entrée %
Zone PID			
Adjohoun	84	32	61,90
Dangbo	84	48	42,85
Missérété 1	84	5	94,04
Missérété 2	288	4	98,61
Sèmè	388	0	100
PN plateau (Témoin)	88	132	-50
Zone MIILD			
Adjohoun	91	72	20,88
Dangbo	82	100	-21,95
Sèmè	90	216	-140
PN périphérique (Témoin)	404	384	4,95

2-1-2- Variation du taux d'endophilie de *An. gambiae*

Durant la période avant intervention, sur 928 *An. gambiae* capturés par les pièges fenêtres et le spray matinal, 623 étaient endophiles, soit un taux moyen d'endophilie de 67,13% pour l'ensemble des localités PID. Mais après les interventions ce taux a été très faible (8,33%) à Dangbo et nul dans les autres communes PID. Par contre, dans la localité témoin PID le taux d'endophilie a été stable à 51% ($P > 0,05$) (Tableau XXI). Dans les localités périphériques de Adjohoun, Dangbo et Sèmè où les MIILDs ont été distribuées, les taux d'endophilie ont également baissé, respectivement à 11,11 % (8/72) ; 52% (52/100) ; 34,25% (74/216) après les interventions de MIILDs. Mais à Dangbo la baisse n'a pas été significative ($P > 0,05$) (Tableau XXI). Il en est de même dans la zone témoin du bras MIILD : 53,46% et 52,08% après intervention ($P > 0,05$). Lorsque l'on compare les 2 bras PID et MIILDs dans les

mêmes communes, le taux de réduction est plus élevé dans le bras PID : 100% contre 43,95% dans la commune de Sèmè. Cette situation est similaire à Adjohoun et à Dangbo.

Tableau XXI: Taux d'endophilie de *An. gambiae* observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè

Localités	Avant intervention (Mai à juillet 2008)				Après intervention (Mai à juillet 2009)			
	Effectif total capturé	Effectif capturé par spray	Taux d'endophilie		Effectif total	Effectif capturé par spray	Taux d'endophilie	
			Moy	Interv Conf			Moy	Interv Conf
Zone PID								
Adjohoun	84	58	68,83 ^a	[58,67-79,00]	32	0	0 ^b	[00-00]
Dangbo	84	53	63,33 ^a	[51,41-75,26]	48	4	8, 33 ^b	[08, 33-08, 33]
Missérété 1	84	52	61,83 ^a	[53,14-70,52]	5	0	0 ^b	[00-00]
Missérété 2	288	210	73 ^a	[66,50-79,50]	4	0	0 ^b	[00-00]
Sèmè	388	250	63,67 ^a	[56,72-70,62]	0	0	-	-
PN plateau (Témoin)	88	45	49,33 ^a	[41,19-57,48]	132	68	51,67 ^a	[47,04-56,30]
Zone MIILD								
Adjohoun	91	55	60,50 ^a	[51,93-69,07]	72	8	11,11 ^b	[-00,98-22,98]
Dangbo	82	50	61,50 ^a	[55,14-67,86]	100	52	52 ^a	[43,15-60,18]
Sèmè	90	55	60,83 ^a	[51,32-70,35]	216	74	32,50 ^b	[27,37-37,63]
PN périphérique (Témoin)	404	216	53,33 ^a	[49,54-57,13]	384	200	52,08 ^a	[45-55]

Moy : Moyenne ; Interv Conf : Intervalle de confiance. (Pour chaque commune et pour un même paramètre du tableau, les valeurs de la même ligne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ($p>0,05$)).

2-1-3- Variation du taux de gorgement de *An. gambiae*.

Avant les interventions, le taux de gorgement de *An. gambiae* était élevé dans toutes les localités : 52, 38%, 54,3%, 50,7%, 62,2% et 54,3% respectivement pour Adjohoun, Dangbo, Missérété₁, Missérété₂ et Sèmè dans le bras PID (Tableau XXII). Après la PID, ces taux ont diminué de façon significative (Tableau XXII). Cette situation est similaire dans les bras MIILDs, où la distribution de moustiquaires supplémentaires aux populations des zones marécageuses de Adjohoun et Dangbo a conduit à une baisse significative de la proportion de *An gambiae* gorgés (Tableau XXII). Mais tel n'est pas le cas à Sèmè où le taux de gorgement a augmenté de 58,3% à 72,3%, malgré la distribution des MIILDs. En ce qui concerne les localités témoins, une diminution du taux de *An gambiae* gorgé a été observée, mais pas de façon significative ($P> 0,05$).

Tableau XXII: Taux de gorgement de *An. gambiae* observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè

Localités	Avant intervention (Mai à juillet 2008)				Après intervention (Mai à juillet 2009)			
	Effectif total capturé	Effectif de gorgés	Moy	Taux de gorgement Interv Conf	Effectif total capturé	Effectif de gorgés	Moy	Taux de gorgement Interv Conf
Zone PID								
Adjohoun	84	44	52,38 ^a	[50,37-53,63]	32	11	34,3 ^b	[04,10-64,40]
Dangbo	84	46	54,3 ^a	[50,37-58,30]	48	8	16,5 ^b	[-34,82-66,82]
Missérété 1	84	43	50,7 ^a	[44,86-56,48]	5	2	41,5 ^b	[-66,50-149,50]
Missérété 2	288	180	62,2 ^a	[58,11-66,23]	4	2	50 ^b	[50,00- 50,00]
Sèmè	388	213	54,3 ^a	[43,74-64,93]	0	-	-	-
PN plateau (Témoin)	88	52	61,7 ^a	[49,86-73,48]	132	80	60 ^a	[50,20-69,80]
Zone MIILD								
Adjohoun	91	61	66,7 ^a	[61,90-71,44]	72	20	33,3 ^b	[19,79-46,88]
Dangbo	82	57	70,2 ^a	[62,05-78,28]	100	22	22 ^b	[18,35-25,30]
Sèmè	90	52	58,3 ^a	[49,19-67,47]	216	152	72,3 ^b	[57,13-87,54]
PN périphérique (Témoin)	404	264	64,3 ^a	[56,69-71,98]	384	200	54,7 ^a	[43,87-65,46]

Moy : Moyenne ; Interv Conf : Intervalle de confiance. (Pour chaque commune et pour un même paramètre du tableau, les valeurs de la même ligne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ($p>0,05$)).

2-1-4- Variation du taux de gravidité de *An. gambiae*.

Avant l'intervention, sur 928 moustiques capturés par le spray et les pièges fenêtres, 348 étaient gravides (37,5%) dans le bras PID. Le taux le plus élevé (41,6%) a été enregistré à Missérété et le plus bas (30,16%) à Adjohoun. Par contre après la PID, aucun moustique gravide n'a été collecté dans toutes les localités traitées (Tableau XXIII), bien que le taux de gorgement ait varié entre 16,5% et 50% (Tableau XXII). La PID n'a donc pas empêché les femelles *An. gambiae* de se gorger, mais elle a empêché leur repos dans les maisons. Dans le bras MIILD, les performances des moustiquaires n'ont pas été aussi spectaculaires (Tableau XXIII). Le taux de gravidité a baissé de 31,08% et 24,98% respectivement à Adjohoun et Dangbo, alors qu'il a augmenté à Sèmè de 25,01%. Cette augmentation est en corrélation avec celle du taux de gorgement constaté à Sèmè contrairement à toutes les autres localités. Dans les localités témoins le taux de gravidité a aussi baissé de 2,5% dans le bras PID et de 14,17% dans le bras MIILD (Tableau XXIII).

Tableau XXIII: Taux de gravidité de *An. gambiae* observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè

Localités	Avant intervention (Mai à juillet 2008)				Après intervention (Mai à juillet 2009)			
	Effectif total capturé	Effectif de gravides	Taux de gravidité Moy	Interv Conf	Effectif total capturé	Effectif de gravides	Taux de gravidité Moy	Interv Conf
Zone PID								
Adjohoun	84	26	30,16 ^a	[23,82-36,51]	32	0	0 ^b	[00-00]
Dangbo	84	31	36 ^a	[33,10-38,89]	48	0	0 ^b	[00-00]
Missérété 1	84	29	33,66 ^a	[29,93-37,40]	5	0	0 ^b	[00-00]
Missérété 2	288	120	41,16 ^a	[38,24-44,09]	4	0	0 ^b	[00-00]
Sèmè	388	142	36,16 ^a	[29,03-43,29]	0	-	-	-
PN plateau (Témoin)	88	35	41 ^a	[32,98-49,01]	132	53	40 ^a	[33,42-46,57]
Zone MIILD								
Adjohoun	91	41	44,33 ^a	[41,10-47,56]	72	22	30,55 ^b	[19,01-53,98]
Dangbo	82	38	46,66 ^a	[41,08-52,24]	100	35	35 ^b	[18,72-57,61]
Sèmè	90	35	38,66 ^a	[32,45-44,88]	216	101	48,33 ^a	[37,99-58,67]
PN périphérique (Témoin)	404	176	42,33 ^a	[37,16-47,50]	384	133	36,33 ^a	[28,80-43,86]

Moy : Moyenne ; Interv Conf : Intervalle de confiance. (Pour chaque commune et pour un même paramètre du tableau, les valeurs de la même ligne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ($p>0,05$)).

2-1-5- Variation du taux de mortalité de *An. gambiae*.

Durant la période avant l'intervention , le taux de mortalité a été pratiquement nul (4 femelles mortes sur un total de 928 femelles *An. gambiae* capturées). Par contre après la PID, l'effet létal du bendiocarb a été très significatif avec les taux de mortalité respectifs de 64,58% ; 80% et 75% à Dangbo, Missérété₁ et Missérété₂. A Adjohoun ce taux a été faible (37,5%), en revanche, il est demeuré nul dans la zone témoin (Tableau XXIV). Malgré le caractère non répulsif connu du bendiocarb, cet insecticide a provoqué une forte répulsion sur *An. gambiae* en réduisant fortement le taux d'entrée des anophèles de 90,40% (Tableau XXIV). Cela n'a pas favorisé la détermination du taux de mortalité à Sèmè par exemple où aucun *An. gambiae* n'a été recueilli dans les pièges fenêtres de sortie et par le spray. En ce qui concerne la localité témoin, le taux de mortalité a été nul durant toute la durée de l'étude (Tableau XXIV). Dans les localités où les MIILD ont été distribuées, les pourcentages de mortalité obtenus ont été aussi nuls avant l'intervention. Toutefois après la distribution des MIILDs, ces taux sont passés respectivement à 8.33%, 23% et 13.88% dans les localités de Adjohoun, Dangbo et Sèmè. Comparativement à l'effet létal du bendiocarb dans les zones PID, les MIILDs se sont révélées moins létale sur les populations de *An. gambiae*.

Tableau XXIV: Taux de mortalité de *An. gambiae* observé avant et après interventions dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.

Districts	Avant intervention (Mai à juillet 2008)				Après intervention (Mai à juillet 2009)			
	Effectif total capture	Effectif de moustiques morts	Taux	Interv Conf	Effectif total capture	Effectif de moustiques morts	Taux	Interv Conf
Zone PID								
Adjohoun	84	2	0,33 ^a	[-00,20-00,87]	32	12	37,5 ^b	[14,53-60,46]
Dangbo	84	1	0,16 ^a	[-00,26-00,59]	48	31	64,58 ^b	[38,58-89,41]
Missérété 1	84	1	0,16 ^a	[-00,26-00,59]	5	4	80 ^b	[-33-199]
Missérété 2	288	0	0 ^a	[00-00]	4	3	75 ^b	[-42,65-192,65]
Sèmè	388	0	0 ^a	[00-00]	0	0	0 ^a	[00-00]
PN plateau (Témoin)	88	1	0,16 ^a	[-00,26-00,59]	132	0	0 ^a	[00-00]
Zone MIILD								
Adjohoun	91	0	0 ^a	[00-00]	72	6	8,33 ^b	[-00,29-19,29]
Dangbo	82	0	0 ^a	[00-00]	100	23	23 ^b	[13,46-37,53]
Sèmè	90	1	0,16 ^a	[-00,26-00,59]	216	30	13,88 ^b	[11,22-15,77]
PN périphérique (Témoin)	404	0	0 ^a	[00-00]	384	0	0 ^a	[00-00]

Moy : Moyenne ; Interv Conf : Intervalle de confiance. (Pour chaque commune et pour un même paramètre du tableau, les valeurs de la même ligne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ($p>0,05$)).

2-1-6- Variation du taux d'endophagie de *An. gambiae*

Durant la période avant intervention, *An. gambiae* a été plus endophage qu'exophage dans toutes les localités (figure 34). Les taux d'endophagie ont été respectivement de 85,43%; 72,14% ; 79,57% ; 70,43% ; 64,43% à Porto-Novo, Adjohoun, Dangbo, Missérété₁, Missérété₂ et Sèmè. Mais après l'intervention PID *An. gambiae* se gorgerait préférentiellement sur les captureurs disposés à l'extérieur des cases. En effet, sur un total de 635 *An. gambiae*, 49,76% ont été capturés à l'intérieur des cases après intervention PID, comparativement à un taux de 67,09% avant intervention PID. Dans la localité témoin ce taux est passé de 85,43% à 75,29% ($p>0,05$) durant la même période. Dans les localités périphériques de Adjohoun, Dangbo et Sèmè où les MIILDS ont été distribuées les taux d'endophagie ont également baissé (figure 34).

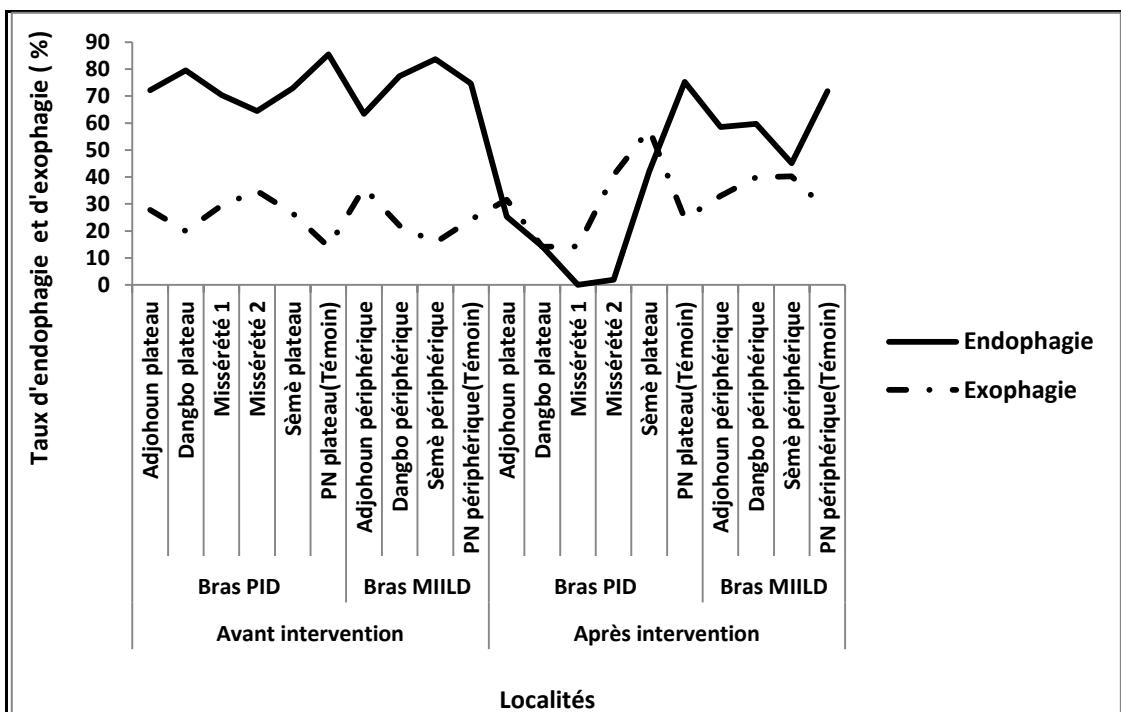


Figure 34 : Variation des taux d'endophagie et d'exophagie de *An. gambiae* avant et après les interventions de PID dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.

2-2-Discussion et conclusion

2-2-1-Discussion

La forte diminution du taux d'entrée des populations naturelles de *An. gambiae* dans les chambres, pourrait s'expliquer par l'environnement stressant créé par la pulvérisation. Un tel environnement devrait logiquement favorisé une réduction de l'entrée des moustiques dans les chambres. Ce résultat est corroboré par des travaux de Akogbéto *et al.*, (2011) qui ont montré que la pulvérisation du bendiocarb sur les murs, crée une atmosphère nocive pour les moustiques et favorise une augmentation de leur taux d'exophilie. Cette efficacité pourrait être due à l'effet de masse du bendiocarb utilisé à grande échelle. En effet, dans les localités PID, 2.623 kg de bendiocarb ont été pulvérisés dans 142.814 chambres pendant la première intervention et 2.751 kg de bendiocarb ont été pulvérisés dans 156.233 chambres au cours de la deuxième intervention, soit 90 à 100% de chambres ont été traités, selon RTI (Research Triangle Institute) qui a effectué l'opération de pulvérisation. Des études antérieures avaient montré que l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à l'échelle communautaire engendre un effet de masse (Howard *et al.*, 2000) traduit par une forte mortalité et un changement de comportement du vecteur. Mais ces études n'ont pas précisé la taille de

moustiquaires utilisées à l'échelle communautaire ayant engendré cet effet de masse. Toutefois, les données analysées sur une cohorte d'enfants, ont révélé, qu'une augmentation du niveau de l'utilisation de ces MIILDs a été associée à une diminution significative du risque de développer un paludisme chez chaque enfant habitant les zones situées à des distances allant jusqu'à 1,5 km (Howard *et al.*, 2000). La faible efficacité des MIILDs pourrait être aussi justifiée par le fait que certains bénéficiaires ne les ont pas utilisé, mais ont continué à utiliser les moustiquaires non traitées qu'ils avaient avant la distribution. De plus, il a été démontré que la chaleur, l'étouffement, les croyances et les tabous semblent être des obstacles à l'utilisation des moustiquaires dans le département de l'Ouémé (Padonou *et al.*, 2011a). Il est également possible, en raison de leurs mauvaises conditions de vie, que des bénéficiaires vendent les MIILDs pour régler d'autres problèmes, comme c'était le cas dans les essais parrainés par l'OMS au Congo et en Tanzanie (Curtis, 2000). Pour que les MIILDs soient pleinement efficaces, cela exige que les membres de la communauté soient activement impliqués dans la stratégie d'intervention, pour s'assurer que les moustiquaires soient utilisées, même pendant les saisons où l'utilisation est désagréable à cause de la chaleur et où les piqûres des insectes ne semblent pas assez nombreuses pour justifier cette utilisation (Curtis, 2000). Le taux d'endophilie de *An. gambiae* observé durant la période pré intervention est similaire aux résultats d'études antérieures sur le comportement des anophèles (Mouchet, 1957, Faye *et al.*, 1997). Après les interventions de la PID et la distribution gratuite des MIILDs la diminution du taux d'endophilie observée dans la zone PID s'est manifestée par la forte diminution de la proportion de femelles gravides et semi gravides. En outre, la réduction du taux d'entrée de *An. gambiae* pourrait également justifier ce changement de comportement. Malgré cet effet dissuasif, une faible proportion de *An. gambiae* pénètre dans les chambres et vont directement piquer leur hôte pour prélever du sang avant de se reposer sur les murs ou cherchent à s'échapper. Mais une fois posé sur les murs, les *An. gambiae* s'intoxiquent au bendiocarb. En effet, des études antérieures menées en cases expérimentales (N'Guessan *et al.*, 2007 ; Djènontin *et al.*, 2009 ; Akogbéto *et al.*, 2010) ont prouvé l'efficacité des carbamates sur *An.gambiae*. En outre, la présente étude a confirmé l'absence de résistance de *An. gambiae* au bendiocarb dans le sud du Bénin (Djogbénou *et al*, 2008;.; Yadouléton *et al*, 2010 ; Padonou *et al.*, 2011). A l'inverse, la résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes (Akogbéto *et al*, 1999 ; N'Guessan *et al*, 2007; Yadouleton *et al*, 2010 ; Padonou *et al*, 2011) a été corroborée et pourrait justifier la différence d'efficacité entre les MIILDs imprégnés de deltaméthrine et la PID à base du bendiocarb. Le comportement exophile et exophage constaté chez *An gambiae* après intervention indique

que les facteurs relatifs à la localité et les variations climatiques saisonnières auraient peu d'effet sur les changements de comportement de prise de repas de sang humain. L'utilisation d'outils de lutte antivectorielle et les comportements de l'hôte seraient les principaux facteurs qui modifient le comportement de prise de repas de sang humain observé chez *An. gambiae*. En effet des études récentes (Reddy *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011) ont montré que l'application à long terme à l'intérieur des insecticides à effet rémanent contribue à une tendance accrue à l'exophagie au sein des populations de vecteurs du paludisme. Bien que le bendiocarb s'est révélé efficace pour la PID, il a l'inconvénient d'avoir un court effet résiduel (Najera et Zaim, 2004; Akogbeto *et al.*, 2009). Dans ce cas, malgré la modeste efficacité des MIILDs contre les populations de *An. gambiae* résistantes aux pyréthrinoïdes, elles sont nécessaires pour compléter l'action de la PID en raison de la longue durée d'action de la deltaméthrine et du rôle de barrière mécanique joué par cet outil (Curtis *et al.*, 1998) contre les moustiques.

2-2-2-Conclusion

La campagne PID réalisée dans le département de l'Ouémé a montré que le bendiocarb appliqué sur les murs des habitations humaines est accompagné d'une modification de comportement des anophèles. Le changement de comportement s'est traduit essentiellement par une diminution des taux de piqûres et du repos à l'intérieur des maisons. Seulement, la protection personnelle conférée par les MIILDs et la protection collective conférée par la PID ne permettent pas de protéger les populations contre les piqûres à l'extérieur des chambres. Ces 2 stratégies ne suffisent donc pas pour éradiquer le paludisme. Il y a donc une nécessité de mesures de protection complémentaires et de recherche de stratégies alternatives orientées sur l'éducation sanitaire, l'autonomisation des populations et l'utilisation d'outils comme les médicaments antiparasitaires, les larvicides et les répulsifs.

3-Impact de la PID à base de bendiocarb et de la couverture en PermaNet 2.0 sur la transmission du paludisme dans une zone de forte résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes.

L'évaluation et la surveillance des vecteurs est une composante essentielle de l'exécution des programmes nationaux de lutte contre les maladies. C'est l'objectif visé par la présente évaluation de l'impact de la PID à grande échelle et la distribution des MIILDs sur la

transmission du paludisme dans les zones de forte résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes.

3-1-Résultats

3-1-1-Diminution drastique du nombre de piqûres de moustiques (Culicidae) dans les zones d'interventions

-Cas des zones d'intervention PID

Avant la mise en œuvre de la PID, nous avons récolté un total de 6.916 moustiques (*Mansonia spp.*, *Culex spp.*, *An. gambiae*, *An. ziemanni*, *An. pharoensis*, *An. coustani*) de janvier à mars 2008, lors de la saison sèche au bout de 48 séances de captures hommes-nuits dans les 4 communes retenues pour la PID. La moyenne des piqûres/homme/nuit (p/h/n) est mentionnée dans le tableau XXV pour chaque commune. Après le premier tour de PID, seulement 803 moustiques ont été collectés pour la même période. La comparaison de ces données indique une réduction drastique du p/h/n de: 88,3% (Adjohoun), 92,7% (Dangbo), 95,8% et 89,5% (Missérété₁ et Missérété₂) et 85,6% (Sèmè) (tableau XXV). En effet, avant les interventions PID dans les districts de Sèmè et Adjohoun, chaque personne a reçu respectivement 59,6 et 43,5 piqûres entre janvier et mars. Mais après les interventions ces taux ont diminué respectivement à 8,6 et 5,1 piqûres par nuit (tableau XXV). A Dangbo et Missérété, le nombre de piqûres de moustiques par nuit a diminué respectivement de 8,2 à 0,6 et de 16,5 à 0,7. Ces diminutions sont très élevées montrant l'efficacité de la stratégie de la PID. La même analyse a été faite pour la saison des pluies après la PID (Avril-Juillet 2009). Les données obtenues (tableau XXV) montrent le même niveau de réduction des taux d'agressivité de l'homme qu'en saison sèche: 80,8% à Dangbo, 83,3% à Missérété₁ et 83,2% à Missérété₂. Mais à Sèmè et Adjohoun, si la réduction obtenue après la PID est significative ($p < 0,05$), elle est moins élevée (respectivement 43,6% et 23,2%) par rapport aux diminutions constatées à Dangbo et Missérété.

-Cas des zones d'intervention MIILD

La réduction de la densité des moustiques n'a pas été observée que dans les zones d'intervention PID. Elle a été également constatée dans les zones où le PNLP a distribué des

MIILDs. Par exemple, durant la saison des pluies, le taux d'agressivité (tableau XXV) a connu une diminution de 43,7 à 21 p/h/n (51,9% de réduction) à Adjohoun alors qu'en saison sèche ce taux est passé de 120,9 à 12 p/h/n (90,1% de réduction). Tel que mentionné pour l'intervention PID, dans les zones sous la protection des MIILDs, la diminution des taux d'agressivité de *An.gambiae* a été plus élevée pendant la saison sèche qu'en saison des pluies (tableau XXV). Par exemple à, Sèmè la réduction du p/h/n a été de 85,5% en saison sèche contre 57% qu'en saison des pluies ($p < 0,05$)..

Tableau XXV: Taux d'agressivité des Culicidés et pourcentage de réduction observés avant et après intervention dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.

	Saison sèche (Janvier à mars)					Saison pluvieuse (Avril à juillet)				
	Effectif total	Nbre de captureurs . nuits	p/h/n		% Red du nbre de p/h/n	Effectif total	Nbre de captureurs . nuits	p/h/n		%Red du nbre de p/hn
			Moy	[IC 95 %]				Moy	[IC 95 %]	
Adjohoun										
Avant PID	2090	48	43,5	[27,00 - 60,08]		1048	64	16,4	[05,12-27,63]	
Après PID	243	48	5,1	[-03,41 -13,53]	88,3	806	64	12,6	[-08,10-33,29]	23,2
Avant MIILDs	5804	48	120,9	[101,35- 140,48]		2796	64	43,7	[15,54-71,84]	
Après MIILDs	575	48	12	[01,11 - 22,85]	90,1	1343	64	21	[-03,62-45,59]	51,9
Dangbo										
Avant PID	392	48	8,2	[-03,79-20,12]		634	64	9,9	[-04,22-24,03]	
Après PID	29	48	0,6	[-00,16-01,37]	92,7	122	64	1,9	[01,06-02,75]	80,8
Avant MIILDs	7244	48	150,9	[-01,02-302,86]		8204	64	128,2	[93,31-163,07]	
Après MIILDs	435	48	9,1	[-06,88-25,00]	94,0	1568	64	24,5	[16,37-32,63]	80,9
Missérété 1										
Avant PID	794	48	16,5	[-03,03-36,12]		1500	64	23,4	[-23,89-70,77]	
Après PID	33	48	0,7	[-00,40-01,77]	95,8	249	64	3,9	[01,09-06,69]	83,3
Missérété 2										
Avant PID	778	48	16,2	[-00,18-32,60]		760	64	11,9	[01,79-21,96]	
Après PID	83	48	1,7	[-02,89-06,35]	89,5	129	64	2	[00,26-03,77]	83,2
Sèmè										
Avant PID	2862	48	59,6	[-79,93-199,18]		1046	64	16,3	[01,45 -31,23]	
Après PID	415	48	8,6	[01,97-15,32]	85,6	586	64	9,2	[-09,72-28,03]	43,6
Avant MIILDs	1858	48	38,7	[-35,66-113,08]		2726	64	42,6	[12,80 -72,39]	
Après MIILDs	271	48	5,6	[-06,90-18,20]	85,5	1173	64	18,3	[07,19 -29,47]	57,0
PN (Témoin)										
Avant PID	860	48	17,9	[06,94 -28,89]		1220	64	19,1	[14,11-24,01]	
Après PID	401	48	8,4	[-07,89-24,60]	53,1	1705	64	26,6	[06,22-47,06]	-39,3
Avant MIILDs	4584	48	95,5	[-48,59-239,59]		3128	64	48,9	[-21,52-119,27]	
Après MIILDs	1617	48	33,7	[10,12-57,26]	64,7	4362	64	68,2	[04,82-131,50]	-39,5

Nbre de captureurs.nuits : Nombre de captureurs.nuits; p/h/n: piqûres/ homme/nuit; Moy: Moyenne; IC: Intervalle de confiance; % Red du nbre de p/h/n: Pourcentage de réduction du nombre de piqûres/ homme/nuit.

3-1-2-Diminution des piqûres de moustiques *An. gambiae* dans les zones d'interventions

-Cas des zones d'intervention PID

Pendant toute la période d'étude, le p/h/n de *An. gambiae* a été particulièrement faible. Dans la zone témoin PID, seulement 1 *An. gambiae* a été recueilli par homme et par nuit, pendant la

saison sèche de Janvier à Mars 2008. Au cours de la saison des pluies (Avril à Juillet 2008), le taux d'agressivité de *An. gambiae* a été relativement plus élevé: 3,5 p/h/n en 2008 et 14 p/h/n en 2009 (tableau XXVI). Dans les zones PID, c'est la même situation, avant la mise en œuvre de la PID, le maximum de piqûres était de 9,86 p/h/n à Missérété₂ et 15,11 p/h/n à Sèmè entre Janvier et Juillet 2008. La comparaison des deux périodes (avant et après intervention) a montré une diminution drastique du taux d'agressivité de *An. gambiae* dans les zones d'intervention PID. En fait, dans toutes les communes PID, le taux d'agressivité a diminué de 2,43 à 0,64 p/h/n (73,6% de réduction), 2,93 à 0,14 p/h/n (95,2% de réduction), de 9,86 à 1,08 p/h/n (89,04%), de 15,1 à 4,79 p/h/n (68,3%) respectivement à Adjohoun, Dangbo, Missérété₂ et Sèmè.

-Cas des zones d'intervention MIILD

La réduction des taux d'agressivité a également été constatée après une hausse du taux de couverture des moustiquaires Permanet 2.0 gratuitement distribuées aux populations par l'appui de PMI. Dans la commune de Sèmè 1 habitant a reçu 24,43 piqûres de *An. gambiae* par nuit de Janvier à Juillet 2008, avant la distribution gratuite de PermaNet 2.0. Après cette distribution, le p/h/n a baissé à 6,11 pendant la même période, soit 75% de réduction (tableau XXVII). Le même niveau de réduction a été observé à Dangbo (72,6%). A Adjohoun, la baisse a été faible: de 8 à 3,95 (50,63% de réduction) (tableau XXVII). En comparant l'impact de la PID et des MIILDS dans les mêmes communes en termes de réduction du taux de piqûres de *An. gambiae*, la baisse en raison de la PID a été globalement plus élevée (tableaux XXVI et XXVII). Par exemple, il a été observé une réduction de 73,66% (zone d'intervention PID) contre 50,63% à Adjohoun (zone d'intervention MIILD) ($p < 0,05$) et 95,22% (zone d'intervention PID) contre 72,6% à Dangbo (zone d'intervention MIILD) ($p < 0,05$).

Tableau XXVI: Taux d'agressivité, taux d'inoculation entomologique de *An. gambiae* et pourcentage de réduction observé avant et après PID dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.

		Avant intervention				Après intervention			
		Saison sèche Janvier à mars 2008	Saison pluvieuse Avril à juillet 2008	Janvier à juillet 2008		Saison sèche Janvier à mars 2009	Saison pluvieuse Avril à juillet 2009	Janvier à juillet 2009	% réduction
Adjohoun	Effectif total	65	207	272		8	64	72	
	Captureurs. Nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	1,35	[-0,04-2,75]	3,23 [-1,11-7,57]	2,43 [0,40-4,46]	0,17 [-0,55-0,88]	1 [-0,14-2,14]	0,64 [0,00-1,28]	73,66
	S%	0	5,71	3,12		0	0	0	
	TIE (pi/h/n)	0	0,18	0,07		0	0	0	100
Dangbo	Effectif total	48	280	328		0	16	16	
	Captureurs. Nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	1	[0,69-1,31]	4,375 [0,91-7,84]	2,93 [0,74-5,12]	0 [0,00-0,00]	0,25 [-0,22-0,72]	0,14 [-0,09-0,37]	95,22
	S%	2,08	4,49	3,64		0	0	0	
	TIE (pi/h/n)	0,02	0,19	0,10		0	0	0	100
Missérété₁	Effectif total	38	98	136		11	0	11	
	Captureurs. Nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	0,79	[0,29-1,29]	1,53 [0,45-2,61]	1,21 [0,63-1,80]	0,23 [-0,76-1,22]	0 [0,00-0,00]	0,1 [-0,14-0,34]	91,73
	S%	0	0	0		0	0	0	
	TIE (pi/h/n)	0	0	0		0	0	0	-
Missérété₂	Effectif total	160	944	1104		0	121	121	
	Captureurs. Nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	3,33	[-1,37-8,04]	14,75 [3,68-25,82]	9,86 [2,54-17,18]	0 [0,00-0,00]	1,89 [-0,40-4,18]	1,08 [-0,25-2,41]	89,04
	S%	0	1,07	0,71		0	0,84	0,84	
	TIE (pi/h/n)	0	0,15	0,07		0	0,01	0,009	87,14
Sèmè	Effectif total	100	1592	1692		29	507	536	
	Captureurs. Nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	2,08	[-1,34-5,50]	24,88 [-2,11-51,86]	15,11 [-0,72-30,93]	0,6 [-0,33-1,54]	7,92 [-6,65-22,49]	4,79 [-2,21-11,78]	68,29
	S%	1,92	3,5	3,01		0	0	0	100
	TIE (pi/h/n)	0,04	0,87	0,45		0	0	0	
PN (Témoin)	Effectif total	48	224	272		50	896	946	
	Captureurs. Nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	1	[-1,48-3,48]	3,5 [0,38-6,62]	2,43 [0,57-4,29]	1,04 [-0,05-2,13]	14 [-21,57-49,57]	8,45 [-7,52-24,41]	-248,14
	S%	0	4,3	2,98		8,16	6,34	6,85	
	TIE (pi/h/n)	0	0,15	0,07		0,08	0,88	0,57	-7,14

p/h/n: piqûre/homme/nuit; S%: Indice sporozoïtique; TIE (pi/h/n): Taux d'inoculation entomologique (piqûres infectantes/homme/nuit)

Tableau XXVII: Taux d'agressivité, taux d'inoculation entomologique de *An. gambiae* et pourcentage de réduction observé avant et après distribution des MIILDs dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.

		Avant intervention				Après intervention			
		Saison sèche Janvier à mars 2008	Saison pluvieuse Avril à juillet 2008	Janvier à juillet 2008		Saison sèche Janvier à mars 2009	Saison pluvieuse Avril à juillet 2009	Janvier à juillet 2009	% Reduction
Adjohoun	Effectif total	59	837	896		64	378	442	
	Captureurs. nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	1,23	[0,23- 2,22]	13,08	[0,66-25,49]	8	[0,23-15,77]	1,33	[-1,79- 4,45]
	S%	0	1,17	0,87		0	0	0	
	TIE (pi/h/n)	0	0,15	0,07		0	0	0	100
Dangbo	Effectif total	384	1520	1904		42	480	522	
	Captureurs. nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	8	[-17,82-33,82]	23,75	[0,71- 46,79]	17	[3,54-30,46]	0,875	[-1,59-3,34]
	S%	0	4,70	2,86		0	2,20	1,80	
	TIE (pi/h/n)	0	1,11	0,48		0	0,16	0,08	83,33
Sèmè	Effectif total	288	2448	2736		11	673	684	
	Captureurs. nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	6	[-13,37-25,37]	38,25	[13,65- 62,85]	24,43	[5,10-43,76]	0,23	[-0,32-0,77]
	S%	0	4,83	3		0	0,9	0,84	
	TIE (pi/h/n)	0	1,84	0,73		0	0,09	0,05	93,15
PN (Témoin)	Effectif total	1008	2208	3216		390	2312	2702	
	Captureurs. nuits	48	64	112		48	64	112	
	p/h/n	21	[-10,35-52,35]	34,5	[-7,27-76,27]	28,71	[9,10-48,33]	8,13	[-7,74-23,99]
	S%	2	3,33	3		1,53	3,57	2,92	
	TIE (pi/h/n)	0,42	1,14	0,86		0,12	1,29	0,7	18,6

p/h/n: piqûre/homme/nuit; S%: Indice sporozoïtique; TIE (pi/h/n): Taux d'inoculation entomologique (piqûres infectantes/homme/nuit)

3-1-3-Baisse drastique des taux d'inoculation entomologique dans les zones d'interventions

-Cas des zones d'intervention PID

Les TIE ont été respectivement de 0,07 ; 0,10 ; 0,07 et 0,45 piqûres infectantes par homme et par nuit (pi/h/n) à Adjohoun, Dangbo, Missérété₂ et Sèmè au cours de Janvier-Juillet 2008. Dans la localité témoin chaque habitant a reçu 0,07 pi/h/n (tableau XXVI). Ces valeurs ont représenté 14,7 piqûres infectantes par homme à Adjohoun, Missérété₂ et à Akron de Janvier à Juillet. A Dangbo et Sèmè, le taux a été plus élevé: respectivement 21 et 94,5 piqûres infectantes par homme pour cette période. Après la PID presque la totalité des analyses ELISA ont été négatives pour l'antigène de *Plasmodium falciparum* dans les 4 communes pendant la période de Janvier à Juillet 2009. Les rares moustiques collectés n'ont pas été infectés, sauf à Missérété₂ où le TIE a été de 0,009 piqûre infectante de Janvier à Juillet. Toutefois, à la même période, chaque habitant de la zone de contrôle (Akron) a reçu 0,57 piqûre infectée par nuit, soit 119,7 piqûres infectantes de Janvier à Juillet (tableau XXVI).

-Cas des zones d'intervention MIILD

Dans la zone des MIILDS, les nombres de piqûres infectantes / nuit étaient de 0,07, 0,48 et 0,73 respectivement à Adjohoun, Dangbo et Sèmè au cours de Janvier à Juillet 2008 (tableau XXVII). Après la distribution des moustiquaires imprégnées, les taux de réduction du TIE ont été respectivement de 100, 83,3 et 93,15% à Adjohoun, Dangbo et Sèmè (tableau XXVII).

3-1-4-Variation des taux de parturité dans les zones d'interventions

Avant la PID, le taux de parturité de *An. gambiae* a été élevé. Il a été compris entre 70,68% à Missérété₁ et 79,5 % à Sèmè. Après la PID, une baisse drastique a été observée dans tous les sites d'intervention: 79,5% à 33,3% à Sèmè ; 75,5% à 26,3% à Missérété₂. A Adjohoun et Dangbo, tous les *An. gambiae* disséqués et examinés au microscope ont été trouvés nullipares. Dans les zones MIILD, le taux de parturité a été diminué significativement (tableau XXVIII), mais pas à Adjohoun ($p > 0,05$).

Tableau XXVIII : Variation du taux de parturité de *An. gambiae s.l.* collecté avant et après intervention dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè.

Localités	Zone PID				Comparaison du taux de parturité (%) avant et après PID	Zone MIILD				Comparaison du taux de parturité (%) avant et après MIILD		
	Avant intervention (janvier à juillet 2008)		Après Intervention (janvier à juillet 2009)			Avant intervention (janvier à juillet 2008)		Après Intervention (janvier à juillet 2009)				
	Nbre diss	Parturité (%)	Nbre Diss	Parturité (%)		Nbre diss	Parturité (%)	Nbre diss	Parturité (%)			
Adjohoun	128	79.41	72	0	(p< 0.05)	229	68.18	121	61.15	(p > 0.05)		
Dangbo	137	78.83	16	0	(p< 0.05)	279	73.11	166	61.44	(p< 0.05)		
Missérété 1	116	70.68	11	54.54	(p > 0.05)							
Missérété 2	139	75.53	118	26.27	(p< 0.05)							
Sèmè	166	79.51	123	33.33	(p< 0.05)	200	80.5	118	39.83	(p< 0.05)		
PN témoin	134	67.16	175	80.57	(p< 0.05)	200	80	205	80	(p > 0.05)		
Total	820	75.48	515	42.52	(p< 0.05)	908	75	610	63.44	(p< 0.05)		

Nbre diss: Nombre collecté et disséqué; PID: Pulvérisation Intradomiciliaire ; MIILD: Moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée.

3-1-5-Variation de l'incidence palustre dans les zones d'interventions

Les résultats de l'incidence palustre par commune avant et après la mise en place des interventions sont présentés dans le tableau XXIX. L'incidence du paludisme a varié selon les localités et les classes d'âges. Dans toutes les communes la classe d'âge des enfants de moins de 5ans est la plus touchée. Pour l'ensemble des 4 communes, l'incidence du paludisme grave a significativement baissé (OR= 0.86 ; p<0,001) chez les enfants de moins de 5ans en 2010 par rapport à 2007. Cette baisse est similaire pour les cas de paludisme simple (OR=0.84; p<0,001) et tous les cas confondues de paludisme (OR= 0.86; p<0,001) chez les personnes âgées de 5ans et plus. Par contre, l'incidence du paludisme simple a augmenté chez les enfants de moins de 5ans en 2010 par rapport à 2007(OR= 1,19 ; p<0,001).

Tableau XXIX: Incidence d'accès palustres en fonction des classes d'âges et des communes avant et après intervention

Enfants d'âge < 5ans										
		Avant interventions (Année2007)			2ans après interventions (Année2010)			Odds ratio (OR)		
		NC	I (%)	Int conf	NC	I (%)	Int conf			
Adjohoun	P simple	2149	19,91	[19,81-20,01]	2185	18,48	[18,39-18,57]	1,02 (p=0,5)		
	P grave	380	3,52	[3,48-3,56]	679	5,74	[5,70-5,79]	1,79 (p<0,001)		
Dangbo	P simple	3027	23,97	[23,88-24,07]	3909	28,26	[28,15-28,37]	1,29 (p<0,001)		
	P grave	669	5,30	[5,26-5,34]	253	1,83	[1,81-1,85]	0,38 (p<0,001)		
Missérété	P simple	2688	19,35	[19,28-19,43]	4079	26,81	[26,70-26,92]	1,52 (p<0,001)		
	P grave	177	1,27	[1,26-1,29]	80	0,53	[0,51-0,54]	0,45 (p<0,001)		
Sèmè	P simple	6745	30,62	[30,53-30,71]	8058	33,42	[33,32-33,52]	1,19 (p<0,001)		
	P grave	385	1,75	[1,73-1,77]	516	2,14	[2,12-2,16]	1,34 (p<0,001)		
		Total			P simple		1,19 (p<0,001)			
					P grave		0,86 (p<0,001)			
					P simple et grave		1,13 (p<0,001)			
Personnes d'âge ≥ 5ans										
		Avant interventions(Année2007)			2ans Après interventions (Année2010)			Odds ratio (OR)		
		NC	I (%)	Int conf	NC	I (%)	Int conf			
Adjohoun	P simple	3976	7,15	[07,13-07,18]	3200	5,21	[05,19-05,23]	0,71 (p<0,001)		
	P grave	1149	2,07	[02,05-02,08]	1086	1,77	[01,76-01,78]	0,85 (p<0,001)		
Dangbo	P simple	7337	11,28	[11,25-11,32]	5353	7,45	[07,43-07,48]	0,63 (p<0,001)		
	P grave	1123	1,73	[01,72-01,74]	603	0,84	[00,83-00,85]	0,48 (p<0,001)		
Missérété	P simple	4206	5,88	[05,86-05,90]	5107	6,47	[06,45-06,48]	1,11 (p<0,001)		
	P grave	450	0,63	[00,62-00,64]	370	0,47	[00,46-00,47]	0,74 (p<0,001)		
Sèmè	P simple	13468	11,87	[11,85-11,90]	13586	10,84	[10,82-10,86]	0,9 (p<0,001)		
	P grave	699	0,62	[00,61-00,62]	1652	1,32	[01,31-01,33]	2,16 (p<0,001)		
		Total			P simple		0,84 (p<0,001)			
					P grave		0,98 (p=0,445)			
					P simple et grave		0,86 (p<0,001)			
Total de tous les âges					P simple		0,95 (p=0,003)			
					P grave		0,94 (p<0,001)			
					P simple et grave		0,94 (p<0,001)			

- P : Paludisme ; NC : Nombre de cas ; I (%) : Incidence du paludisme ; Int conf : Intervalle de confiance.

- OR > 1 et p < 0,05 : Incidence plus élevée en 2010 par rapport à 2007 ;

- OR < 1 et p < 0,05 : Incidence plus faible en 2010 par rapport à 2007 ;

- OR = 1 et p > 0,05 : Incidence en 2010 n'est pas différente par rapport à 2007.

3-2-Discussion et conclusion

3-2-1-Discussion

Le Programme National de Lutte contre le paludisme a adopté la PID comme l'une de ses stratégies de lutte anti-vectorielle contre le paludisme. La campagne de l'Ouémé est le premier essai. Selon les autorités du Ministère de la Santé, en cas de succès, la stratégie sera étendue dans les autres parties du Bénin où *An. gambiae* a développé une forte résistance aux pyréthrinoïdes. Les résultats de cette évaluation sont en faveur de cette extension. Dans toutes les communes le TIE a été réduit de façon drastique de 94,4%. Cela se justifie probablement par l'envergure de la campagne. Dans les 4 communes, plus de 90% des maisons ont été traitées. Par ailleurs, les 4 communes sont contigües si bien que la pulvérisation a couvert une très grande surface où vivent près de 350 000 habitants. Les maisons de ce vaste territoire sont rendues désagréables pour le repos des moustiques. Le premier défi pour le PNLP d'identifier un non-pyréthrinoïde comme insecticide de remplacement pour les campagnes de la PID au Bénin, est atteint. Le bendiocarb a émergé comme un insecticide prometteur pour le contrôle des populations de vecteurs qui sont résistantes aux pyréthrinoïdes. De nombreux pays, tels que le Mexique (Arredondo *et al.*, 1990), le Zimbabwe (Mpofu *et al.*, 1991), les Philippines (Asinas *et al.*, 1994) et l'Afrique du Sud (Hargreaves *et al.*,) ont significativement fait baisser l'incidence du paludisme en utilisant ce produit. De même, des études antérieures effectuées en cases expérimentales ont montré que certains organophosphorés et les carbamates ont été particulièrement efficaces contre les populations naturelles de vecteurs hautement résistants aux pyréthrinoïdes (Padonou, 2008). C'est l'une des raisons qui ont motivé Zaïm et Guillet (2002) à suggérer que la recherche de méthodes de contrôle autres que les pyréthrinoïdes devrait être une priorité pour les PNLP en Afrique. Les résultats de cette évaluation renforcent le souhait du PNLP d'étendre la stratégie dans les autres parties du Bénin où *An. gambiae* a développé une forte résistance aux pyréthrinoïdes. Le succès enregistré dans l'Ouémé est dû à plusieurs facteurs. Outre l'effet létal du bendiocarb sur les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes (N'Guessan *et al.*, 2007 ; Akogbéto *et al.*, 2010) dans la zone PID, malgré le traitement des maisons, certaines personnes, en particulier les enfants et les femmes enceintes, continuent de dormir sous moustiquaires. À l'inverse, les zones PID sont des régions inhospitalières pour la survie des moustiques dont la plupart mourraient avant la fin du cycle sporogonique de *Plasmodium falciparum*. L'atmosphère désagréable créée par la présence de bendiocarb sur les murs intérieurs des maisons est

probablement nocive pour les moustiques. Cette nocivité s'est traduite par une diminution du taux d'endophilie et d'endophagie (Padonou *et al.*, données non publiées). Malgré cette efficacité, la PID a ses limites. L'une des insuffisances du bendiocarb appliqué en PID dans l'Ouémé est la facilité que les moustiques ont à continuer à se gorger sur leurs hôtes à l'intérieur des maisons. Cette situation a été constatée lors des travaux réalisés en cases expérimentales pour de nombreux insecticides (Akogbéto *et al.*, 2010) et au niveau communautaire (Damien *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous avons proposé que le PNLP invite les communautés qui sont protégés par la PID au bendiocarb à compléter les efforts de lutte contre le paludisme par l'utilisation des MIILDs. Cette combinaison protège non seulement les maisons de l'invasion par les moustiques, mais empêche également le contact entre les humains et les moustiques. Les populations bénéficient dans ce cas non seulement de la protection collective de la PID (Curtis et Mnzava, 2001) mais aussi d'une protection individuelle contre les piqûres de moustiques. Des études antérieures effectuées au Kenya (O'Meara *et al.*, 2008 ; Okiro *et al.*, 2010) ont rapporté une diminution significative des cas d'hospitalisation du paludisme qui a coïncidé avec l'intervention de l'utilisation des moustiquaires à grande échelle et un changement dans la politique d'utilisation des médicaments antipaludiques. En effet, la baisse de l'incidence du paludisme grave et du paludisme simple a été observée chez les personnes de 5ans et plus dans les communes de Dangbo et de Adjohoun sous intervention. De plus, une baisse significative de l'incidence du paludisme grave chez les enfants de moins de 5ans et de celle du paludisme simple et grave des personnes âgées de 5ans et plus, ont été observées pour les 4 communes prises ensemble. La stratégie de PID et de distribution de MIILDs est donc prometteuse. En revanche, nos résultats sont contraires à ceux de Trape (2000) qui avait rapporté que ce serait une erreur de croire que les moustiquaires imprégnées peuvent aider à réduire d'une façon significative la morbidité et la mortalité dues au paludisme en Afrique tropicale.

La rareté des résultats positifs à l'antigène circum sporozoïtique, ne signifie pas que la transmission du paludisme a été interrompue. Probablement des personnes continuaient à recevoir quelques piqûres infectantes de *An. gambiae*. Cela pourrait être l'une des raisons qui justifient l'augmentation de l'incidence du paludisme observée chez les enfants de moins de 5ans dans la commune de Sèmè, malgré la baisse drastique du TIE. Par ailleurs les dispositions sécuritaires prises par le PNLP n'ont pas permis de pulvériser les habitations en bambou de Sèmè. En effet, ces habitations non pulvérisées pourraient être la source du maintien de la transmission. Mais les données cliniques collectées ne reflètent pas la situation réelle des cas de paludisme dans les zones PID. Ces données sont communes à l'ensemble de

la commune et sont collectées dans des conditions qui ne sont certainement pas identiques à celles de 2007 avant la mise en place des interventions. Cette situation justifie également l'augmentation de l'incidence du paludisme simple chez les enfants de moins de 5ans en 2010 par rapport à 2007. En effet des cas de fièvre due à d'autres maladies auraient été considérés comme des cas de paludisme simple. De même, Rogier *et al.*, (1999) ont rapporté qu'en zone de forte endémie palustre, distinguer le paludisme d'autres causes de fièvre pose de difficiles problèmes méthodologiques en raison de la fréquence élevée des infections asymptomatiques, du peu de spécificité des symptômes de la maladie et du caractère erratique de la fièvre lors des accès palustres.

Malgré les effets bénéfiques de la PID et des MIILDs rapportés par la présente étude, les limites qu'imposent les comportements humains à ces outils de lutte nécessite que les efforts de lutte antipaludique doivent également viser l'amélioration de l'accès aux soins et à une meilleure prise en charge des malades tant au niveau familial que communautaire et des services de santé.

3-2-2-Conclusion

La campagne de PID réalisée dans le département de l'Ouémé, au Bénin, par le PNLP grâce à l'appui du President' Malaria Initiative (PMI) du gouvernement américain, a été un succès. Cette campagne est la première opération de grande envergure qui devait se poursuivre dans d'autres régions du pays si les résultats obtenus sont encourageants. Non seulement les résultats sont bons, les communautés ont toutes apprécié positivement la stratégie à laquelle elles ont entièrement adhéré. Dans les quatre communes, le taux de piqûres des anophèles a baissé de façon radicale. Une réduction de 100% du taux d'inoculation a été enregistrée après la PID. Certes, la positivité en protéine CS a été trouvée nulle dans les quatre communes pendant toute la durée de l'étude, mais cela ne veut pas dire que la transmission du paludisme a été interrompue. Deux facteurs expliquent les faibles taux d'inoculation: la baisse de la longévité des anophèles dans les zones traitées et une exophilie induite dans les maisons où l'environnement est rendu désagréable à la survie des moustiques. Toutefois, il y a un bémol. La mise en œuvre de la PID au bendiocarb ne doit pas exclure l'utilisation des moustiquaires par la communauté. En effet, *An. gambiae* n'a pas cessé de se gorger, malgré la PID à base de bendiocarb. La meilleure stratégie est l'association PID+LLIN. Cette combinaison, non seulement protège les maisons contre l'invasion des moustiques, elle empêche également le contact entre l'homme et les moustiques qui auront réussi à entrer dans les maisons traitées.

4- Etude de la rémanence des insecticides sur les supports imprégnés

La pulvérisation intradomiciliaire à base de bendiocarb s'est révélée efficace contre *An. gambiae* résistant aux pyréthrinoïdes. Toutefois la durée d'efficacité du bendiocarb a été relativement peu satisfaisante sur l'ensemble des supports imprégnés. Par ailleurs en zone de forte résistance de *An.gambiae* aux pyréthrinoïdes comme le département de l'Ouémedé, il s'avère nécessaire d'apprécier la validité du concept de "long lasting" (longue durée d'action) attribué à ces moustiquaires, en milieu communautaire. La présente étude se justifie donc par son importance à pouvoir des informations supplémentaires au PNLP sur la durée d'efficacité du bendiocarb selon les supports et celle de la deltaméthrine sur les moustiquaires afin de planifier le temps de retraitement des supports. Pour des raisons de logistique seules les communes d'Adjohoun et de Dangbo ont été prises en compte.

4-1- Résultats

4-1-1- Effet résiduel du bendiocarb sur les différents supports

Les résultats de l'effet résiduel du bendiocarb sur les différents supports sont présentés dans le tableau XXX. Aucune baisse d'efficacité du bendiocarb aussi bien contre *An. gambiae* Kisumu et *An. gambiae* sauvage n'a été observée sur le support « bouse de vache » après 5 mois de traitement et quel que soit le round. Un mois (T_0) après le premier tour de pulvérisation (en 2008), le taux de mortalité de *An. gambiae* sauvage sur les supports banco, ciment, métal, et bois traités avec du bendiocarb a été respectivement de 89,9%, 96,19%, 96,46% et 93,74%. A partir du deuxième mois, ce taux a commencé par diminuer progressivement atteignant respectivement 24,33%; 25,95%; 62,64%; et 60,7% au quatrième mois pour les supports banco, ciment, métal, et bois. Après les traitements de 2009 et 2010 le taux de mortalité de *An. gambiae* sauvage a été de 100% du premier au quatrième mois sur tous les supports traités à l'exception du banco et du ciment. Sur le support banco au quatrième mois, la mortalité a évolué de 48,19% au 2^{ème} tour à 78,57% et 91,67% respectivement au 3^{ème} et 4^{ème} tour. Une observation similaire a été faite sur le support ciment avec des taux de mortalité de 54,63% ; 92,72% et 95,56% respectivement au 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} tour. Avec la souche sensible Kisumu, jusqu'au deuxième mois après traitement, le taux de mortalité n'a pas varié, quel que soit le traitement et le support, il a été de 100%. Pour les supports ciment, banco, bois et métal, il y a une différence significative entre les mortalités obtenues au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} round avec la souche sauvage du 1^{er} au 4^{ème} mois ($p=0,00$).

Par ailleurs, pour la souche sensible Kisumu une différence significative a été observée au quatrième mois avec les supports banco, ciment, métal et bois ($p=0,00$). Par contre, aucune différence significative n'a été observée pour le support bouse de vache quelle que soit le type sauvage ou sensible.

Le temps au bout duquel 80% des moustiques exposés aux supports traités meurent a été différent selon les supports et le nombre de tours de traitement (Tableau XXXI). Avec *An. gambiae* sauvage au 1^{er} tour de traitement, ce temps a été respectivement de 38 jours, 49 jours, 65 jours et 62 jours pour les supports banco, ciment, métal, bois. A partir du 2^{ème} tour de traitement, ce temps a été seulement calculable pour les supports banco et ciment (les taux de mortalité étant restés égaux à 100% dans le temps pour les autres supports). Pour ces 2 supports, le temps au bout duquel 80% des moustiques exposés meurent a augmenté à partir du 2^{ème} tour de traitement pour atteindre respectivement 100 jours (banco) et 118 jours (ciment) au 4^{ème} tour. Avec *An. gambiae* Kisumu, ce temps a été respectivement de 99 jours, 150 jours, 172 jours, et 170 jours pour les supports banco, ciment, métal, bois. Au 2^{ème} tour de traitement, ce temps est passé à 113 jours et 160 jours respectivement pour les supports banco et ciment. Pour les supports métal et bois ce taux a été de 100% a partir du 2^{ème} tour. Il a été de même a partir du 3^{ème} tour pour les supports banco et ciment.

Tableau XXX : Taux de mortalité de *An. gambiae* sauvage et *An. gambiae* "Kisumu" exposé aux différents supports imprégnés de bendiocarb, en fonction du temps et des tours de traitement

Temps	Supports	% Mortalité <i>An. gambiae</i> Sauvage				% Mortalité <i>An. gambiae</i> Kisumu			
		1er tour	2e tour	3e tour	4e tour	1er tour	2e tour	3e tour	4e tour
T0	Banco	89,9	100	100	100	100	100	100	100
	Ciment	96,19	100	100	100	100	100	100	100
	Métal	96,46	100	100	100	100	100	100	100
	Bois	93,74	100	100	100	100	100	100	100
	bouse de vache	100	100	100	100	100	100	100	100
T1	Banco	47,08	100	100	100	100	100	100	100
	Ciment	58,6	100	100	100	100	100	100	100
	Métal	68,54	100	100	100	100	100	100	100
	Bois	59,59	100	100	100	100	100	100	100
	bouse de vache	100	100	100	100	100	100	100	100
T2	Banco	29,52	100	100	100	93,36	100	100	100
	Ciment	40,4	100	100	100	98,69	100	100	100
	Métal	56,1	100	100	100	100	100	100	100
	Bois	41,84	100	100	100	98,88	100	100	100
	bouse de vache	100	100	100	100	100	100	100	100
T3	Banco	24,33	48,19	78,57	91,67	86,47	79,48	100	100
	Ciment	25,95	54,63	92,72	95,56	95,13	73,04	100	100
	Métal	62,64	100	100	100	97,78	100	100	100
	Bois	60,7	100	100	100	97,75	100	100	100
	bouse de vache	100	100	100	100	100	100	100	100

% Mortalité : pourcentage de mortalité

Tableau XXXI : Temps (en nombre de jours) au bout duquel 80% des moustiques exposés aux supports traités sont susceptibles de mourir selon les différents tours de traitement

Tours	Supports	Sauvage	Kisumu
1 ^{er} Tour	Banco	38	99
	Ciment	49	150
	Métal	65	172
	Bois	62	170
	Bouse de vache	-	-
2 ^{ème} Tour	Banco	60	113
	Ciment	61	160
	Métal	-	-
	Bois	-	-
	Bouse de vache	-	-
3 ^{ème} Tour	Banco	90	-
	Ciment	107	-
	Métal	-	-
	Bois	-	-
	Bouse de vache	-	-
4 ^{ème} Tour	Banco	100	-
	Ciment	118	-
	Métal	-	-
	Bois	-	-
	Bouse de vache	-	-

- : indéterminé

4-1-2- Variation de l'effet résiduel du bendiocarb en fonction de la position du cône sur les supports traités

Après 4 tours de PID dans l'Ouémé, l'efficacité des murs traités au bendiocarb a été très bonne. Nous avons noté un effet résiduel assez long. En effet, 4 mois après le 4^{ème} round de pulvérisation, nous avons noté 100% de mortalité chez les spécimens de *An.gambiae* souche Kisumu mis en contact avec les murs traités lors des bioessais (figure 35). Après 5 mois, l'efficacité est toujours bonne : plus de 90% des anophèles testés n'ont pas résisté à l'action du bendiocarb. Certes, nous avons noté une légère baisse de taux de mortalité (97,78% pour les cônes placées en haut des murs en ciment), mais la différence n'est pas significative ($p>0,05$). Concernant l'homogénéité des résidus de bendiocarb sur les supports, elle est demeurée bonne durant 5 mois après le 4^{ème} round de pulvérisation. En comparant les taux de mortalité observés chez les anophèles des cônes fixés en haut (96,67-97,78%) et au milieu des murs (93,33%), aucune différence significative n'a été notée ($p>0,05$). Les meilleurs supports

qui retiennent l'insecticide plus longtemps sont les portes en bois, en métal et les murs en bouse de vache (100% de mortalité des anophèles 5 mois après le 4^{ème} round de PID) (figure 36). Les performances de ces supports sont étendues à *An.gambiae* sauvage. L'effet résiduel noté sur les portes en bois, en métal et sur les murs en bouse de vache est suffisant pour induire 100% de mortalité sur ce type sauvage. Toutefois, l'efficacité des murs en banco est plus brève (3mois) pour ce même type (figure 36).

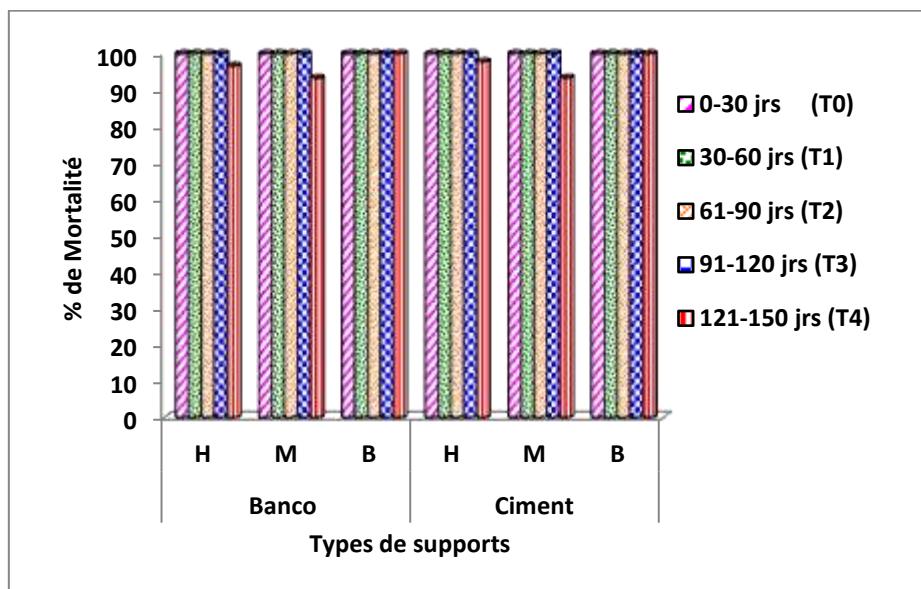


Figure 35 : Evolution du taux de mortalité de *An. gambiae* souche sensible Kisumu en fonction de la position (haut, milieu, bas) du cône sur les supports

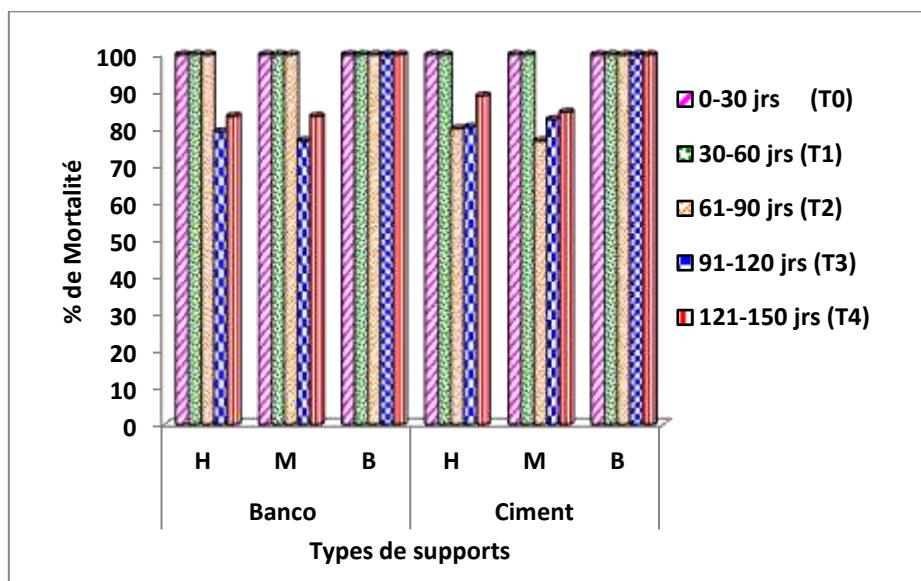


Figure 36 : Evolution du taux de mortalité de *An. gambiae* sauvage en fonction de la position (haut, milieu, bas) du cône sur les supports

4-1-3-Vérification du concept de long lasting attribué aux moustiquaires de type Permanet 2.0

De 1 à 9 mois d'utilisation, la mortalité après 24 heures de *An gambiae* Kisumu a été de 100% et permet de dire que les moustiquaires Permanet 2.0 imprégnées à la deltaméthrine sont efficaces pendant au moins 09 mois d'utilisation contre les souches sensibles de *An gambiae* aux pyréthrinoides (Tableau XXXII). Par contre cette efficacité est faible avec *An gambiae* sauvage. En effet, durant 1 à 3 mois d'utilisation la mortalité des *An gambiae* après 24 heures a été de 100%, puis a baissé à 93,10% ($P>0,05$) au 4^{ème} mois. On constate une chute brutale de cette mortalité qui est passée de 93,10% au 4^{ème} mois à 22,9% au 7^{ème} mois pour s'annuler au 9^{ème} mois (Tableau XXXII). Entre les mortalités du 1^{er} au 4^{ème} mois et celles du 5^{ème} au 6^{ème} mois, il ya une différence significative ($P< 0,05$). Les moustiquaires de type Permanet 2.0 perdent donc leur efficacité vis-à-vis de *An gambiae* du milieu d'étude à partir du 5^{ème} mois d'utilisation.

Tableau XXXII : Résultats des bioessais effectués avec des *An gambiae* sensible et sauvage sur les moustiquaires Permanet2.0 en fonction de la durée d'utilisation.

Paramètres	Durée d'utilisation (Mois)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Souche sensible Kisumu									
Total testé/moustiquaire	29	28	29	29	29	28	28	30	29
Morts	29	28	29	29	29	28	28	30	29
Vivants	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Mortalité (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Population sauvage									
Total testé/moustiquaire	29	28	29	29	29	28	28	30	29
Morts	29	28	29	27	19	16	7	1	00
Vivants	00	00	00	2	10	12	21	29	29
Mortalité (%)	100	100	100	93,10	65,51	57,14	22,9	3,33	00

4-2- Discussion et conclusion

4-2-1- Discussion

La présente étude a révélé que l'activité résiduelle du bendiocarb est plus importante sur le bois, le métal et la bouse de vache que sur les supports banco et ciment. Cette variation pourrait s'expliquer par la différence de porosité des différents supports utilisés. En effet, les supports n'absorbent pas la solution insecticide de la même façon et la biodisponibilité du bendiocarb sur les supports ne serait donc pas la même au cours du temps. La bouse de vache est constituée de lignine, l'un des principaux composants du bois dont les principales fonctions sont d'apporter à ce matériau de la rigidité, l'imperméabilité à l'eau, la grande résistance à la décomposition. De plus, la bouse de vache une fois appliquée sur le mur est lissée et offre une surface adéquate pour la pulvérisation (Najera et Zaim., 2004 ; Padonou *et al.*, 2011). Ces facteurs seraient favorables à une bonne rétention de l'insecticide et donc favoriseraient une activité résiduelle plus importante du bendiocarb sur ce support. Le métal et le bois étant des supports non poreux, ils absorberaient très peu l'insecticide qui resterait disponible pendant plus longtemps sur ces supports. Toutefois, la faible efficacité du bendiocarb sur le banco et le ciment pourrait se justifier par la forte porosité de ces supports d'après Santos *et al.*, (2007). Cette baisse d'efficacité est similaire à celles rapportées par ce même auteur sur la deltaméthrine en suspension concentrée et l'étofenprox en poudre mouillable contre les vecteurs du paludisme au Brésil. En effet, le bendiocarb pulvérisé sur un mur en banco ou en ciment pénètre en profondeur et serait donc moins disponible en surface. De plus, le ciment est basique, car contient du calcaire, alors que la demi-vie du bendiocarb au pH 5 est de 48 jours; au pH 7, elle diminue à 81 heures et en condition alcaline, le bendiocarb s'hydrolyse facilement et a une demi-vie de 45 minutes au pH 9 (FAO, 1983). Dans une autre étude menée au Cameroun, Etang *et al.*, (2011) ont rapporté qu' avec le bendiocarb en poudre mouillable pulvérisé sur différentes surfaces de mur, les taux de knockdown étaient souvent supérieurs à 98% pendant 13 semaines après la pulvérisation, à l'exception des murs de banco où il a diminué significativement à la 13ème semaine ($P <0,05$). Toutefois une autre étude menée en Mozambique a montré que la rémanence du bendiocarb ne varie pas selon la nature des surfaces traitées (Maharaj *et al.* 2004). En Inde, Ansari et Razdan (2004) ont montré qu'après 2 rounds de pulvérisation intradomiciliaire, les bioessais ont révélé une persistance de l'efficacité du bendiocarb utilisé par une mortalité de

100% de *An. culicifacies* sur les murs en banco, en ciment et en briques non crépis respectivement après une période de 10, 8, et 10 semaines après la pulvérisation.

En ce qui concerne l'influence du nombre de traitements, elle pourrait se justifier par l'effet résiduel cumulatif du bendiocarb sur les supports traités. Ces résultats sont contraires à ceux de Coosemans et Sales (1978) à Bobo-Dioulasso qui ont montré que la rémanence du bendiocarb à 0,2g/m² est peu efficace, même après un 2^{ème} traitement, contrairement au malathion et à la déctraméthrine. La plus forte efficacité du bendiocarb notée au bas des murs, pourrait être expliquée par un effet d'entraînement. Quand il pleut, les murs sont humidifiés et l'écoulement de l'eau vers le bas entraîne l'insecticide. Par ailleurs, dans les maisons, les niveaux "haut" et "milieu" des murs sont plus en contact avec l'homme qui a l'habitude de s'adosser au mur, de passer sa main sur le mur et même d'y accrocher des gravures, des tableaux et des vêtements. Toutes ces pressions extérieures subies par les supports traités réduisent la rémanence du bendiocarb à ces différents niveaux.

Les forts taux de mortalité (100%) obtenus pour la souche sensible exposée aux moustiquaires après 9 mois d'utilisation confirment la longue durée d'action attribuée à ces moustiquaires.

Ces données sont en accord avec les travaux de Graham *et al.*, (2005) qui ont montré que les moustiquaires Permanet 2.0 ont conservé une grande efficacité au bout de 21 lavages, avec plus de 97% de mortalité des anophèles de souche sensible dans les essais biologiques de contact durant 3 minutes d'exposition. Mais tel n'a pas été le cas avec les souches sauvages de Adjohoun et Dangbo pour lesquelles l'efficacité n'a pas dépassé 4 mois. En Ethiopie (Fettene *et al.*, 2009) des bioessais effectués avec des colonies sensibles de *An. arabiensis* à la deltaméthrine ont montré une baisse d'efficacité des Permanet 2.0 après 2 à 3 ans d'utilisation traduit par des taux de mortalité moyenne après 24 h de 72,2% et 67% respectivement dans les districts de Buie et Fentalie. L'efficacité des Permanet 2.0 sur la souche sauvage durant les 4 premiers mois d'utilisation, se justifie par la sensibilité de cette souche vis-à-vis de la deltaméthrine. Par contre, la baisse d'efficacité observée après le 4^{ème} mois se justifierait par l'exposition des moustiquaires à la poussière, à la fumée provenant des pratiques culinaires à l'intérieur des chambres et les pressions de lavages. Au Kenya (Atieli *et al.*, 2010) une étude récente a montré que le lavage répété des moustiquaires imprégnées à des intervalles de temps courts à l'aide des méthodes locales de lavage peut rendre la moustique moins efficace dans un court laps de temps d'utilisation dans la prévention contre les vecteurs locaux. Le même auteur a montré que les moustiquaires Permanet 2.0 ont exercé sur des souches sauvages de *An. gambiae* une létalité de 84% et 49% respectivement après 5 et 15 lavages (2 lavages par semaine).

En termes d'efficacité le bendiocarb utilisé en pulvérisation intradomiciliaire a exercé une létalité plus importante sur *An. gambiae* (Akogbéto *et al.*, 2011), mais a une faible rémanence. Cette faible durée d'efficacité souligne la nécessité d'une utilisation complémentaire des MIILDs, qui malgré leur baisse d'efficacité confère une barrière mécanique contre les piqûres de moustiques.

4-2-2-Conclusion

La présente étude a montré que le bendiocarb s'est révélé efficace contre *An. gambiae* résistant aux pyréthrinoïdes. Sa rémanence sur les différents supports imprégnés n'est pas la même. Celle-ci varie en fonction des différents supports traités. Vu la bonne activité résiduelle du bendiocarb sur le métal et le bois, il serait recommandable d'imprégnier les portes, les fenêtres et les plafonds au cours des campagnes de pulvérisation. La PID à base du bendiocarb est une approche à recommander en période de forte transmission et représente une bonne alternative pour la gestion de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes. Toutefois la faible durée d'efficacité du bendiocarb révèle une complémentarité entre la PID et l'utilisation des MIILDs pour un meilleur contrôle de la population des vecteurs du paludisme. Si après quelques mois d'utilisation dans les conditions de terrain des baisses d'efficacité ont été observées avec les MIILDs à cause de la résistance des vecteurs et du lavage, il est nécessaire que les firmes pharmaceutiques développent de nouveaux insecticides en remplacement des pyréthrinoïdes pour l'imprégnation des MIILDs.

5-Dynamique de la résistance de *Anopheles gambiae* dans les communes soumises à la pulvérisation intradomiciliaire de bendiocarb et aux moustiquaires de type Permanet de 2008 à 2010.

Plusieurs études récentes menées au Bénin (Akogbéto et Yakoubou, 1999; Corbel *et al.*, 2007; Akogbéto *et al.*, 2010; Padonou *et al.*, 2011) ont montré que *An.gambiae* est très résistant aux pyréthrinoïdes et au DDT, mais sensible au bendiocarb. C'est dans ce contexte que le PNLP a entrepris une vaste campagne de PID à base de bendiocarb dans les zones non inondables du département de l'Ouémé. Après la première campagne de pulvérisation (Juillet / Août 2008), trois autres campagnes (Mars / Avril 2009, Mars / Avril 2010, Juillet / Août 2010) ont été menées. Lors de ces campagnes, un total de 128.131.5 kg de bendiocarb 80% a été utilisé. Parallèlement, dans les zones où les MIILDs ont été distribuées, plus de 35,120 kg de

deltaméthrine sont (719,4 mg/moustiquaire) traités sur 48.819 moustiquaires accessibles aux moustiques. Dans ces conditions, il est possible que le niveau de résistance initiale soit changé. Ailleurs en Afrique orientale, aucun effet de sélection de la résistance phénotypique n'a été remarqué suite à une utilisation à long terme des MIILDs (Vulule *et al.*, 1996 ; Kulkarni *et al.*, 2007), tandis que d'autres études ont signalé une augmentation rapide de la mutation *kdr* après quatre ans d'utilisation communautaire des MIILDs au Kenya (Stump *et al.*, 2004) et en Guinée équatoriale (Reimer *et al.*, 2005) suite à une grande campagne de PID. Un cas similaire a été également signalé au Niger où il y a eu une augmentation significative de la mutation Leu-Phe chez *An. gambiae* suite à une distribution à l'échelle nationale des MIILDs (Czeher *et al.*, 2008). D'autres études ont montré l'effet des moustiquaires imprégnées d'insecticide sur la sélection possible d'allèles *kdr* chez *An. gambiae* dans des expériences de laboratoire (Corbel *et al.*, 2004) ou en cases expérimentales (Asidi *et al.*, 2005). Au Bénin, le niveau de sensibilité de la population de *An. gambiae* aux carbamates et aux organophosphorés, l'association de la fréquence élevée de la mutation *kdr* avec la résistance phénotypique, et la mise en jeu par *An. gambiae* d'autres mécanismes possibles de résistance sont encore mal compris. La présente étude vise à rapporter le premier cas de l'impact de trois années de pulvérisation à grande échelle de bendiocarb et de la distribution des MIILDs sur la résistance phénotypique, les allèles *kdr* et *ace-1^R* dans les populations naturelles de *An. gambiae s.l.* au sud-est du Bénin. Les résultats fournissent des informations sur l'effet potentiel de la PID à grande échelle et de la distribution en couverture complète des MIILDs sur la sélection des mutations *kdr* et *ace-1^R* et les effets possibles sur la résistance phénotypique à la deltaméthrine et au bendiocarb.

5-1-Résultats

5-1-1- Espèces et formes moléculaires de *An. gambiae*

Les espèces et formes moléculaires de *An.gambiae* collectées de 2007 à 2010 par la technique de capture sur homme sont présentées dans le tableau 1. Au cours de cette étude, *An. gambiae s.s* est le seul membre identifié dans le complexe *An. gambiae*. L'analyse PCR a par ailleurs, montré que tous les *An. gambiae s.s* collectées sont de forme moléculaire M. Aucune forme S n'a été trouvée au cours de la période d'étude.

5-1-2- Fréquences des mutations *kdr* et *ace-1^R* de *An. gambiae* capturé sur homme

La mutation *kdr* a été le principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes identifié dans toutes les localités de 2007 à 2010. La régression logistique univariée, réalisée avec la fréquence *kdr* comme variable dépendante et l'année en tant que covariable a montré dans toutes les localités PID, que la fréquence *kdr* a été associée avec le temps ($p < 0,05$) et a diminué de manière significative en 2009 par rapport à 2007 ($OR = 0,756 < 1$, $p < 0,05$). Toutefois, elle a augmenté de façon significative en 2010 comparativement à 2009 ($OR = 8,120 > 1$, $p < 0,05$). A l'inverse, dans les localités des MIILDs, la fréquence *kdr* a augmenté en 2009 comparativement à 2007 et de façon non significative ($OR = 1,295 > 1$, $p > 0,05$). En 2010 l'augmentation a été plus importante comparativement à 2009 ($OR = 5,107 > 1$, $p < 0,05$). En effet, les fréquences des gènes *kdr* observées ont été similaires en 2007 et 2009 à Dangbo, Missérétré, Adjohoun et Sèmè MIILD, alors qu'elles ont augmenté de façon significative en 2010 (tableau XXXIII). Dans la zone témoin le niveau de la fréquence des gènes *kdr* a été très élevé et stable de 2007 à 2010 ($p > 0,05$). En ce qui concerne la mutation *ace-1^R*, elle a été de 0% de 2007 à 2009 dans toutes les localités. Mais en 2010, des individus hétérozygotes (RS) pour la mutation *ace-1^R* ont été détectés dans toutes les localités 24 mois après le premier tour de la PID, sauf à Adjohoun, Sèmè et le témoin MIILD. Cette variation (0-13%) a été significative dans Sèmè PID, par opposition à une augmentation non significative ($p > 0,05$) remarquée dans les localités PID du témoin, de Dangbo et Missérétré puis dans la localité MIILD de Dangbo. La régression logistique et le test ANOVA ont montré que l'augmentation des fréquences de *kdr* est associée avec les domaines d'intervention et de même avec la zone de contrôle ($p < 0,05$). Comme l'allèle *ace-1^R* a été rarement observé chez les moustiques testés, le test exact de Fisher a révélé que la fréquence *ace-1^R* a été similaire dans les communautés d'intervention par rapport à la zone de contrôle ($p > 0,05$).

Table XXXIII: Espèces, formes moléculaires, mutations *kdr* et *ace-I^R* de *An.gambiae s.l.* collecté sur homme.

Localités	Années	N	Ag	Forme moléculaire				Mutation <i>kdr</i>				Mutation <i>ace.I^R</i>			
				Forme M	RR	RS	SS	f <i>kdr</i>	RR	RS	SS	f <i>ace.I^R</i>			
Témoin PID	2007	22	22	22	20	2	0	0.95 ^a	0	0	22	0 ^a			
	2009	21	21	21	18	3	0	0.92 ^a	0	0	21	0 ^a			
	2010	39	39	39	35	04	0	0.95 ^a	0	5	34	0.06 ^a			
Adjohoun PID	2007	74	74	74	28	34	12	0.61 ^a	0	0	74	0 ^a			
	2009	122	122	122	48	56	18	0.62 ^a	0	0	122	0 ^a			
	2010	24	24	24	21	3	0	0.94 ^b	0	0	24	0 ^a			
Dangbo PID	2007	150	150	150	85	59	6	0.76 ^a	0	0	150	0 ^a			
	2009	263	263	263	133	115	15	0.72 ^a	0	0	263	0 ^a			
	2010	68	68	68	65	3	0	0.98 ^b	0	4	64	0.03 ^b			
Misserete PID	2007	89	89	89	58	31	0	0.83 ^a	0	0	89	0 ^a			
	2009	129	129	129	86	35	8	0.80 ^a	0	0	129	0 ^a			
	2010	46	46	46	43	3	0	0.97 ^b	0	2	44	0.02 ^b			
Sèmè PID	2007	122	122	122	109	1	12	0.90 ^a	0	0	122	0 ^a			
	2009	190	190	190	143	17	30	0.80 ^b	0	0	190	0 ^a			
	2010	22	22	22	19	3	0	0.93 ^a	0	6	16	0.13 ^b			
Témoin MIILD	2007	150	150	150	110	40	0	0.87 ^a	0	0	150	0 ^a			
	2009	101	101	101	90	11	0	0.95 ^b	0	0	101	0 ^a			
	2010	43	43	43	38	5	0	0.94 ^b	0	0	43	0 ^a			
Adjohoun MIILD	2007	52	52	52	14	30	8	0.56 ^a	0	0	52	0 ^a			
	2009	24	24	24	8	16	0	0.67 ^a	0	0	24	0 ^a			
	2010	17	17	17	15	2	0	0.94 ^b	0	0	17	0 ^a			
Dangbo MIILD	2007	124	124	124	66	54	4	0.75 ^a	0	0	124	0 ^a			
	2009	96	96	96	50	40	6	0.73 ^a	0	0	96	0 ^a			
	2010	58	58	58	55	3	0	0.97 ^b	0	3	55	0.02 ^a			
Sèmè MIILD	2007	72	72	72	60	0	12	0.83 ^a	0	0	72	0 ^a			
	2009	44	44	44	31	12	1	0.84 ^a	0	0	44	0 ^a			
	2010	7	7	7	7	0	0	1 ^a	0	0	7	0 ^a			

Ag: *An. gambiae*; f *kdr*: fréquence *kdr*; f *ace.I^R*: fréquence *ace.I^R*. Pour chaque localité d'intervention les valeurs des

fréquences ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes d'une année à une autre ($p > 0,05$).

5-1-3- La sensibilité de *An. gambiae* aux insecticides

La sensibilité des moustiques adultes issus de l'élevage des larves collectées est présentée sur la figure 37. Le statut de résistance des moustiques a été défini selon les critères de l'OMS (OMS, 1998). De 2007 à 2010, la souche sensible Kisumu de *An. gambiae* a montré des taux de mortalité supérieur à 98% pour les 4 insecticides testés (figure 37). Le taux de mortalité de *An. gambiae* 24 h après exposition indique dans toutes les localités une résistance au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine. En revanche, ces moustiques ont été sensibles au bendiocarb avec un taux de mortalité de plus de 99% (figure 37). La régression logistique univariée réalisée avec le taux de mortalité comme variable dépendante et les localités comme une covariable suivi d'un test ANOVA, a montré que la résistance phénotypique au DDT et aux pyréthrinoïdes a été associée aux localités ($p < 0,05$). En effet, cette régression logistique a montré une diminution de la sensibilité des moustiques comparativement aux localités témoins. C'est le cas à Sèmè MIILD pour les insecticides perméthrine (OR = 0,70 [0,51-0,95] ; $p < 0,05$), deltaméthrine (OR = 0,27 [0,15-0,51] ; $p < 0,05$) et DDT (OR = 0,16 [0,11-0,24] ; $p < 0,05$). En ce qui concerne la sensibilité de *An. gambiae* à la deltaméthrine (OR = 0,51 [0,26 - 1]) et à la perméthrine (OR = 0,82 [0,6 à 1,12]) à Adjohoun, elles ont été semblables ($p > 0,05$) à celle de la zone témoin MIILD. Il a été de même pour la sensibilité au bendiocarb qui n'a pas changé dans les zones MIILD et PID par rapport aux zones témoins ($p > 0,05$).

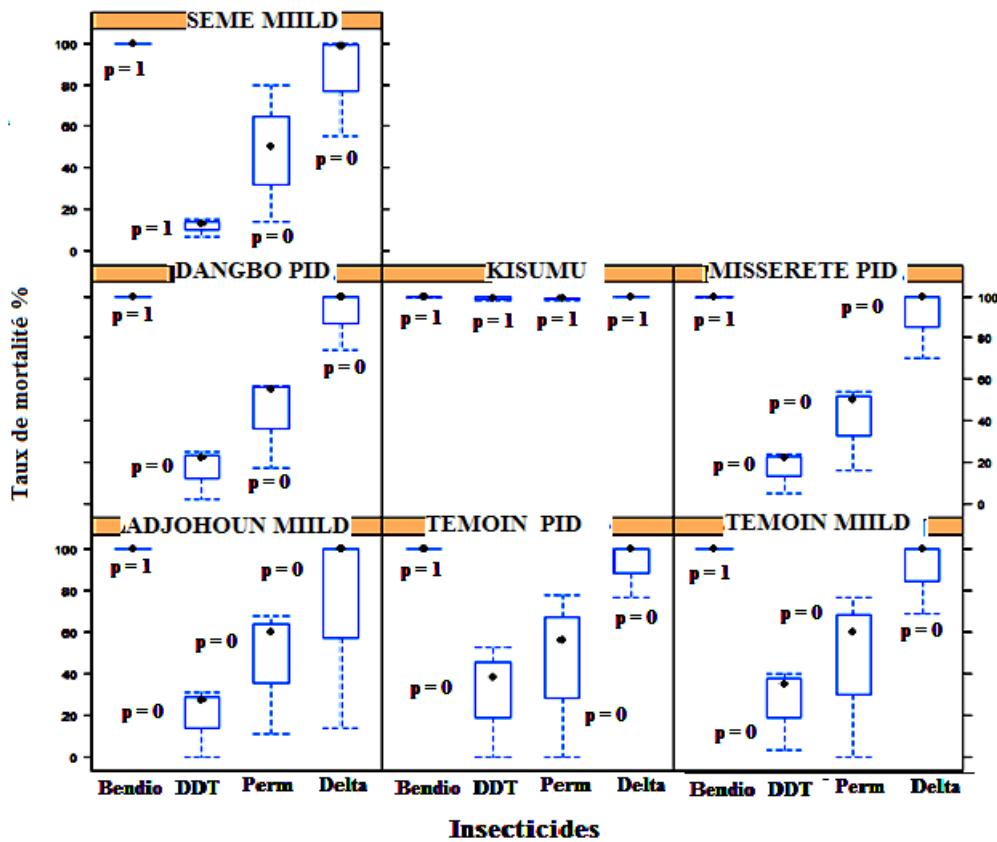


Figure 37 : Variation des taux de mortalité par insecticide de 2007 à 2010 dans chaque localité

5-1-4-Fréquences des mutations *kdr* et *ace.1^R* des survivants et des morts de *An.gambiae* 24 h après exposition aux insecticides.

La mutation *ace.1^R* n'a été détectée chez aucun des rares survivants et des morts de *An. gambiae* soumis à la PCR. L'examen PCR forme effectué sur les moustiques morts et les survivants à la deltaméthrine a montré que 100% de ces moustiques étaient *An. gambiae* ss forme M. Au cours de la période d'étude, les fréquences *kdr* des échantillons de moustiques vivants et morts de Dangbo PID, Missérété PID, Sèmè MIILD et des localités témoins ont été relativement élevées et n'ont pas variées de façon significative ($p > 0,05$) (tableaux XXXIV,XXXV). Les fréquences *kdr* ont varié respectivement de l'ordre de 0,78 à 0,91 pour les vivants et 0,72 à 0,90 pour les moustiques morts. Alors que dans la localité de Adjohoun MIILD, elles sont stables à 0,60 et 0,64 respectivement en 2007 et 2009 et ont augmenté à 0,83 en 2010 pour l'échantillon des survivants (tableau XXXIV). Cette situation a été identique pour les échantillons de moustiques morts dont les fréquences *kdr* ont varié de 0,67 en 2007 à 0,66 en 2009 puis augmenté à 0,77 en 2010 (tableau XXXV). Les coefficients de

corrélation entre la fréquence *kdr* chez les survivants et les taux de mortalité à la deltaméthrine sont respectivement -0,54 ($P > 0,05$), -0,43 ($P > 0,05$) et 0,84 ($P < 0,05$) en 2007, 2009 et 2010.

Tableau XXXIV : Fréquences *kdr* des survivants de *An. gambiae s.l.* 24 h après leur exposition aux insecticides.

Localités	Années	Nombre de survivants testés	Espèces	Formes moléculaires			Mutation <i>kdr</i>	Fréquence <i>kdr</i> (%)
				Ag	M	RR		
Témoin PID	2007	27	27	27	21	6	0	0,89 ^a
	2009	30	30	30	24	6	0	0,90 ^a
	2010	25	25	25	22	3	0	0,86 ^a
Témoin	2007	25	25	25	21	4	0	0,92 ^a
MIILD	2009	28	28	28	23	5	0	0,91 ^a
	2010	25	25	25	22	3	0	0,82 ^a
Adjohoun	2007	50	50	50	22	20	8	0,64 ^a
MIILD	2009	30	30	30	11	14	5	0,60 ^a
	2010	24	24	24	16	8	0	0,83 ^b
Dangbo	2007	58	58	58	37	17	4	0,78 ^a
PID	2009	60	60	60	38	22	0	0,82 ^a
	2010	25	25	25	19	6	0	0,88 ^a
Misserete	2007	56	56	56	40	16	0	0,86 ^a
PID	2009	30	30	30	23	6	1	0,87 ^a
	2010	22	22	22	18	4	0	0,91 ^a
Seme	2007	54	54	54	49	1	4	0,92 ^a
MIILD	2009	21	21	21	19	2	0	0,95 ^a
	2010	25	25	25	20	5	0	0,90 ^a

Ag: *An. gambiae*; Pour chaque localité d'intervention les valeurs des fréquences ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes d'une année à une autre ($p > 0,05$).

Tableau XXXV: Fréquences *kdr* des morts de *An. gambiae s.l.* 24 h après leur exposition aux insecticides.

Localités	Années	Nombre	Espèce	Forme moléculaire	Mutation <i>kdr</i>			Fréquence <i>kdr</i> %	
		de morts testés			Ag	M	RR		
Témoin PID	2007	27	27	27	27	20	7	0	0.87 ^a
	2009	30			30	22	8	0	0.87 ^a
	2010	25			25	20	3	2	0.86 ^a
Témoin MIILD	2007	25	25	25	25	20	5	0	0.90 ^a
	2009	28			28	20	8	0	0.86 ^a
	2010	25			25	19	3	3	0.82 ^a
Adjohoun MIILD	2007	50	50	50	50	21	25	4	0.67 ^a
	2009	30			30	15	10	5	0.66 ^a
	2010	24			24	14	9	1	0,77 ^b
Dangbo PID	2007	58	58	58	58	33	19	6	0,73 ^a
	2009	60			60	34	22	4	0,75 ^a
	2010	25			25	15	6	4	0.72 ^a
Misserete PID	2007	56	56	56	56	39	17	0	0.85 ^a
	2009	30			30	22	6	3	0.81 ^a
	2010	22			22	18	4	3	0.80 ^a
Seme MIILD	2007	54	54	54	54	45	5	4	0.88 ^a
	2009	21			21	15	5	1	0,83 ^a
	2010	25			25	19	4	2	0,84 ^a

Ag: *An. gambiae*; Pour chaque localité d'intervention les valeurs des fréquences ayant la même lettre en exposant ne sont

pas significativement différentes d'une année à une autre ($p > 0,05$).

5-2-Discussion et conclusion

5-2-1-Discussion

Anopheles gambiae s.s. de forme M est la principale espèce vectrice du paludisme dans la région de l’Ouémé. Le même résultat a été obtenu lors d’une étude précédente (Padonou *et al.*, 2011b) sur la distribution des anophèles au sud-est du Bénin, qui a montré l’absence de la forme moléculaire S dans cette zone en raison de ses caractéristiques écologiques non adéquats pour le développement de *An. gambiae* S. Au sein des formes moléculaires M et S de *An. gambiae*, des études antérieures (Coluzzi *et al.*, 1979) avaient montré l’existence de cinq formes chromosomiques en Afrique de l’ouest : les formes Mopti, Savane, Bissau, Forêt et Bamako. Par ailleurs, les résultats de la présente étude ont montré que les fréquences des gènes *kdr* ont été stables de 2007 à 2009 dans la zone MIILD, mais ont augmenté de façon significative en 2010. La cause de cette stabilité de la fréquence du gène *kdr* entre 2007 et 2009 est à établir. En effet, les mêmes résultats ont été obtenus dans la zone de contrôle qui n’a pas bénéficié de la distribution des moustiquaires imprégnées. Une situation similaire a été observée dans une étude dans l’île de Bioko qui a révélé qu’aucun signe d’une augmentation de fréquence *kdr* des populations de *An. gambiae* n’a été constaté malgré l’utilisation de moustiquaires imprégnées d’insecticides pyréthrinoïdes entre 1998 et 2001 (Berzosa *et al.*, 2002). C’est sur la base de cette étude, que la décision a été prise de mettre en œuvre la PID avec un insecticide pyréthrinoïde à Bioko (Sharp *et al.*, 2007). Toutefois une augmentation significative de la fréquence *kdr* a été observée en 2010 à Dangbo, Missérétré, Adjohoun et Sémè MIILD environ 23 mois après la seconde distribution de MILD, et 16 mois après la seconde et pourrait se justifier par la forte corrélation (coefficient de corrélation $R^2 = 0,84$, $P < 0,05$) entre la fréquence *kdr* et le taux de survie obtenu au sein des populations de *An. gambiae* testées avec la deltaméthrine. En effet, au Bénin le principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes est la mutation *kdr* (Leu 1014F). Des études récentes ont montré que cette mutation est en pleine expansion dans le Sud (Djègbè *et al.*, 2011 ; Padonou *et al.*, 2011b) et le Nord du Bénin (Djègbè *et al.*, 2011). Cette expansion de la mutation pourrait aussi justifier l’apparition en 2010 de populations résistantes de *An.gambiae* à la deltaméthrine dans toutes les localités, y compris dans la zone de contrôle. De même, le niveau de la résistance à la perméthrine et au DDT est en augmentation dans toutes les localités confirmant ainsi l’augmentation globale de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les vecteurs du paludisme en Afrique (Ranson *et al.*, 2011). L’analyse univariée a montré que la

résistance phénotypique à la deltaméthrine est significativement plus élevée dans les zones d'interventions des MIILDs que dans la zone contrôle. Des études antérieures ont rapporté que la sélection de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les populations de vecteurs du paludisme est due à l'utilisation extensive de MIILD (Lines, 1988; Protopopoff *et al.*, 2008). Il est donc possible que la sélection de la résistance dans les populations naturelles de *An. gambiae* à la deltaméthrine notée en 2010 dans l'Ouémé soit une conséquence de l'exposition des moustiques adultes aux moustiquaires imprégnées distribuées dans ce département. Il est important de souligner que, outre les MIILDs, la pratique de l'agriculture est l'une des principales activités des populations qui font usage des insecticides pour protéger leurs cultures contre les ravageurs (Akogbéto et Yacoubou, 1999 ; Padonou *et al.*, 2011b). De plus, des bombes aérosols sont utilisées à domicile pour se protéger contre la nuisance des moustiques. La preuve de l'utilisation des insecticides en milieu agricole a été apportée par des études antérieures au Mali qui ont montré une augmentation de la fréquence *kdr* dans les formes S des populations de *An. gambiae* de trois villages entre 1993 et 2004, en l'absence de tout programme de contrôle à grande échelle (Tripet *et al.*, 2007). De nombreux facteurs (MIILD, PID, serpentins anti-moustiques, aérosols, utilisation des pesticides pour la protection des cultures) à l'origine de la sélection des formes résistantes de *An.gambiae* expliquent la variation spatiale de la faible sensibilité de *An.gambiae* aux insecticides. Le gène de résistance *kdr* n'est pas le seul mécanisme de la résistance aux pyréthrinoïdes observée dans la région de l'Ouémé. La forte fréquence de la mutation *kdr* observée chez les individus *An.gambiae* morts à la deltaméthrine justifie probablement cette hypothèse. Exposés pendant plusieurs années aux insecticides, *An.gambiae* développe une résistance à ces produits chimiques par le biais de plusieurs mécanismes d'adaptation. Dans ces conditions, l'utilisation incontrôlée des insecticides devient un problème grave pour la santé publique. En effet, les résultats ont montré une résistance accrue de *An.gambiae* au DDT et aux pyréthrinoïdes non seulement dans les zones d'intervention ciblées, mais aussi dans les zones contrôles. Par conséquent des défis majeurs pour le contrôle du paludisme en Afrique doit inclure la surveillance de la résistance des moustiques aux insecticides, mais aussi l'éducation des populations sur l'utilisation appropriée des insecticides. Malgré ces défis, une étude récente a indiqué que les perspectives pour le contrôle du paludisme ont été améliorées avec une attention particulière aux problèmes de la résistance, suscitant de l'espoir pour la lutte contre le paludisme en Afrique (Ranson *et al.*, 2011). Après quatre tours de PID à base de bendiocarb de 2008 à 2010, *An. gambiae* est demeuré sensible au bendiocarb. Pendant 13 mois après le premier tour de PID et 5 mois après le second tour, la mutation *ace-1^R* n'a été

déTECTée dans aucune localité. L'absence de cette mutation a été positivement corrélée avec les données des essais biologiques. Dans le même ordre, l'efficacité des carbamates utilisés à grande échelle en PID a récemment été démontrée au Mozambique à la fois contre *An. arabiensis* et *An. funestus* (Sharp *et al.*, 2007). Cette susceptibilité de *An. gambiae* aux bendiocarb peut être expliquée par l'absence d'individus homozygotes RR pour la mutation *ace-1^R* dans le département de l'Ouémé. Une autre étude a rapporté que dans les populations de *C. pipiens* la mutation *ace-1^R* a été associée à un coût génétique qui se traduit par la baisse de forme (Raymond *et al.*, 2001). Dans ce cas de mutation *ace-1^R*, chez *C. pipiens* l'acétylcholinestérase fixe moins bien l'insecticide, mais également son substrat naturel (l'acétylcholine), ce qui conduit à une transmission du signal nerveux plus approximative (Weill *et al.*, 2003) et il pourrait en être de même chez *An. gambiae*. Cette hypothèse pourrait également justifier que la fréquence de la mutation *ace-1^R* dans les populations de moustiques *An. gambiae* diminue rapidement après quelques générations en l'absence de pression de sélection de composés organophosphorés ou carbamates insecticides (Labbé *et al.*, 2007). De même Djogbénou *et al.* (2010) ont indiqué que le principal coût de résistance chez *An. gambiae* homozygote pour la mutation G119S, était son aptitude à mourir pendant la nymphose que leurs homologues sensibles. De plus Weill *et al.*, (2003) avaient révélé que sans insecticides, les moustiques mutants (*ace-1^R*) meurent plus jeunes que les moustiques dépourvus de mutations, se développent plus lentement, sont plus fréquemment capturés par des prédateurs et sont plus sensibles aux infections par des bactéries endocellulaires de type *Wolbachia*. Nos résultats ont révélé après le 4^{ème} round de PID en 2010 l'apparition des individus hétérozygote (RS) pour la mutation *ace-1^R*. Ces individus ont été détectés dans quelques localités, avec une variation significative (0-13%) de la fréquence *ace-1^R* à Sèmè PID contrairement aux localités témoin PID, Dangbo (PID et MIILD) et Misséréto PID où la variation de fréquence est non significative ($p > 0,05$). Cette apparition d'individus hétérozygotes dans la zone des interventions en 2010 pourrait être attribuée à une forte pression de sélection, parce que deux tours de PID avaient été réalisés cette année. Mentionnons aussi que, d'autres études avaient démontré que l'émergence de la mutation *ace-1^R* dans les populations naturelles de *An. gambiae* a été associée à l'histoire du traitement insecticide du coton avec les organophosphorés et des carbamates en Afrique occidentale (Dabiré *et al.*, 2009). Dans le cas de la présente étude il est difficile d'identifier l'activité spécifique qui favorise la sélection de la résistance.

5-2-2-Conclusion

Les résultats de cette étude ont confirmé que les populations naturelles de *An.gambiae* dans la région de l'Ouémé ont maintenu leur niveau de résistance aux pyréthrinoïdes, mais sont demeurés sensibles au bendiocarb. Le développement de la résistance à la deltaméthrine a été causée par d'autres facteurs autres que la PID et les MILLDs. Ces résultats ont des implications importantes pour les programmes de lutte contre le paludisme. Tout d'abord, l'évaluation et la surveillance de la résistance aux pyréthrinoïdes et au bendiocarb doit être une priorité pour aider le PNLP dans le choix des insecticides à utiliser dans l'avenir pour la lutte antivectorielle. Deuxièmement, les stratégies de gestion de la résistance devraient être mises en œuvre pour retarder le développement ou l'expansion de la résistance aux insecticides par la rotation ou le mélange de différentes classes d'insecticides. Troisièmement, il est nécessaire de mettre en place un dialogue et des partenariats entre les secteurs de la santé et de l'agriculture afin de coordonner l'utilisation d'insecticides appropriés dans le but d'éviter une sélection anarchique de la résistance.

Chapitre 6 : Discussion générale, conclusion et perspectives

1-Discussion générale

Le maintien d'un équilibre dans le système relationnel dynamique homme/vecteur/parasite (Tosta, 2007) a abouti à une grande stabilité du paludisme qui menace la santé et le travail de nombreuses populations des régions tropicales. L'OMS a recensé, en 2010, 216 millions d'épisodes de paludisme dans le monde, dont 81 % dans la région Afrique et 655 000 cas de décès (OMS, 2011). Au Bénin, dans le département de l'Ouémé, 141 578 cas de paludisme simple et grave ont été enregistrés dont 91 cas de décès parmi les enfants de moins de 5ans en 2010 (Direction Départementale de la Santé Ouémé/Plateau, 2011). C'est pourquoi les PNLP déploient de nombreux efforts avec l'appui des partenaires financiers (UNICEF, Fonds Mondial, PMI, Fondation Bill et Melinda Gates...) dans la lutte contre le paludisme à travers la PID et la distribution massive de moustiquaires imprégnées pour protéger les populations contre cette maladie. Malheureusement, les insecticides utilisés en santé publique ont pendant plus de 30ans souffert de sous-investissement. Le résultat de ce sous-investissement est l'absence de nouvelles classes d'insecticides disponibles pour de larges applications en santé publique (Ranson *et al.*, 2011). L'utilisation des mêmes classes d'insecticides a conduit à l'émergence de la résistance aux pyréthrinoides qui sont actuellement la seule classe d'insecticides approuvée par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires (Zaim *et al.*, 2000). Dans ce contexte, l'une des solutions possibles pour les PNLP, est la recherche d'un insecticide alternatif contre *Anopheles gambiae* résistant aux pyréthrinoides, afin de préserver l'efficacité des outils de lutte. La présente thèse a pour objet de proposer cet insecticide alternatif au PNLP et d'étudier son efficacité à grande échelle dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Misséréto et Sèmè. Dans les zones inondables non éligibles pour la PID les moustiquaires de type Permanet 2.0 imprégnées de deltaméthrine ont été distribuées.

Evaluation en cases expérimentales pour le choix d'un insecticide alternatif

Pour le choix de l'insecticide alternatif, une évaluation portant sur deux pyréthrinoides (deltaméthrine et à l'alpha-cyperméthrine), un carbamate (bendiocarb) et deux organophosphorés (fénitrothion, chlorpyriphos+ deltaméthrine) a été menée en cases expérimentales. Au cours de l'expérmentation, les pyréthrinoides ont été plus dissuasifs pour l'entrée des moustiques dans les cases que le carbamate et les organophosphorés. L'exophilie induite par ces pyréthrinoides sur *An. gambiae* et les culicinés entrés librement dans les cases a été plus élevée, comparativement aux cases traitées au bendiocarb, au fénitrothion et au

mélange chlorpyriphos+deltaméthrine. Par ailleurs, le traitement des cases quel que soit l'insecticide utilisé, n'a pas empêché une proportion non négligeable d'anophèles de se gorger à l'intérieur. Nos résultats ont aussi révélé que la mortalité exercée sur les culicinés est faible avec les organophosphorés, le bendiocarb et les pyréthrinoïdes. Ces résultats confirment les études de Corbel *et al.*, (2007) qui avaient indiqué une multirésistance de *Culex quinquefasciatus* aux insecticides. De même, les pyréthrinoïdes ont eu un très faible effet létal sur *An gambiae*. Seuls les insecticides bendiocarb, fénitrothion et le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine ont réalisé les meilleures performances insecticides contre cette espèce, ce qui s'est traduit par une forte mortalité des anophèles dans les cases traitées. C'est cette mortalité qui a provoqué une fuite moins massive vers l'extérieur et explique le faible nombre des moustiques retrouvés dans les vérandas-pièges. Cependant, la rémanence du bendiocarb a été inférieure à 4 mois et les insecticides fénitrothion et le mélange chlorpyriphos + deltaméthrine ont une mauvaise odeur. Globalement le bendiocarb a donné de bons résultats, tant au niveau de son efficacité insecticide que des effets secondaires. Il est à noter que la faible rémanence du bendiocarb estimée entre 2 et 4 mois d'activité en cases expérimentales, nécessite un traitement des maisons en début de saison des pluies c'est-à-dire en début de la transmission du paludisme. Dans les conditions du sud du Bénin caractérisé par une longue saison pluvieuse, deux tours de pulvérisation sont recommandés pour couvrir toute la période de transmission du paludisme. Deux autres facteurs militent avec le choix du bendiocarb pour la PID au Bénin : le produit est inodore ; il a également reçu l'approbation du WHOPES (Système OMS d'évaluation des pesticides).

Pratiques de lutte antipaludique dans l'Ouémé et adhésion des populations à la pulvérisation intradomiciliaire

Les résultats de l'enquête réalisée sur l'opinion des populations de Adjohoun, Dangbo, Missérétré et Sèmè concernant la campagne PID de l'Ouémé ont montré que l'adhésion à la mise en œuvre de cette stratégie de prévention a été totale. Cette adhésion est favorisée par la nuisance culicidienne dans ces communes et les expériences individuelles des populations basées sur l'utilisation des mesures individuelles de protection contre les piqûres de moustiques en particulier des bombes aérosols. Paradoxalement, la majorité des répondants au questionnaire que nous avons délivré lors de notre enquête ont des perceptions erronées sur la cause du paludisme, probablement à cause du faible niveau de scolarisation. Ce qui suggère la nécessité d'un programme d'éducation sanitaire à l'endroit de la communauté locale pour

corriger les idées fausses sur l'origine du paludisme. L'éducation sanitaire doit également prendre en compte une pratique que nous avons observée, à savoir l'automédication devant les cas de fièvre. Cette automédication n'est pas conseillée, car elle pourrait retarder les consultations médicales et contribuer à augmenter la prévalence des cas graves de paludisme. Des résultats similaires ont été rapportés au Zimbabwe (Vundule et Mharakurwa, 1996), au Togo (Dermin et al., 1989) et en Tanzanie (Kinung'hi et al., 2010). De plus, un faible taux de fréquentation des centres de santé (MS, 2007) de la zone d'étude a été constaté et se justifie par la pratique de l'automédication et le mauvais accueil réservé aux patients par le personnel, l'indisponibilité de médicaments, les attentes prolongées avant l'arrivée du médecin et la distance qui sépare le domicile du centre de santé (Igun, 1987; Ruebush, 1995; Okeke et Okafor, 2008).

Nos résultats ont montré que moins du quart des répondants établissent un lien entre le paludisme et les moustiquaires. La principale raison de l'utilisation des moustiquaires est la protection contre les piqûres de moustiques et pas nécessairement la prévention du paludisme. Au Ghana, Agyepong (1999) a montré que la compréhension de la transmission du paludisme par les moustiques n'influence pas la pratique d'utilisation des moustiquaires. Plutôt la chaleur, la suffocation, certaines croyances et tabous semblent être les obstacles majeurs dans la région de l'Ouémé (Padonou et al., 2011). Cette situation est un réel défi pour le PNLP qui doit après les campagnes de distribution des MIILDs, organiser le suivi de leur utilisation (Djènontin, 2011) dans la mesure où un vaste programme national de distribution de 4.000.000 de MIILDs à raison d'une moustiquaire pour deux personnes est prévu pour l'année 2011 au Bénin. Dans le nord du Ghana Binka et Adongo (1997) ont rapporté que les facteurs saisonniers, les modes d'utilisation et les questions de coût ont été des facteurs clés susceptibles d'influer sur la diffusion et l'efficacité des moustiquaires. Par conséquent la distribution gratuite des MIILDs à toute la population permettrait d'offrir des moyens de protection individuelle à ceux dont le pouvoir d'achat est faible et d'augmenter le taux de couverture et d'utilisation des MIILDs. Il ne s'agira pas pour les PNLP de distribuer seulement des MIILDs, mais il faudrait également mettre en place des stratégies pour encourager les utilisateurs des MIILDs à réparer les MIILDs troués ou déchirés et remplacer les MIILDs qui sont irréparables. Il est à noter que l'implication des femmes dans ces stratégies doit être primordiale à cause du premier rôle qu'elles jouent dans la lutte préventive contre le paludisme à domicile.

Faisabilité de la pulvérisation intradomiciliaire

Pour que la PID soit réellement efficace, elle doit tenir compte de la nature des murs à pulvériser, mais aussi de la bio-écologie et du comportement du vecteur cible. La PID est plus adaptée pour les murs en ciment crépi. En raison des contraintes économiques des populations, la majorité des habitats est en banco, mais avec des murs crépis et lisses qui semblent appropriés à la PID (Najera et Zaïm, 2004). Toutefois, dans notre zone d'étude et particulièrement à Sèmè et dans les zones inondables, beaucoup d'habitations sont en bambou et en paille comportant de larges ouvertures entre le mur et le toit qui facilitent l'entrée et la sortie de nombreux anophèles (Padonou *et al.*, 2011). Pour des raisons de sécurité, ces habitations n'ont pas été prises en compte pour la PID. Cependant des travaux de laboratoire (Rohani *et al.*, 2007) ont révélé que les formulations de deltaméthrine en suspension granuleuse et en poudre mouillable ont été efficaces contre *An.maculatus* jusqu'à 14 mois après la pulvérisation sur les surfaces rugueuse et lisse de bambou. La pulvérisation des habitats en bambou à Sèmè pourrait être tentée. En ce qui concerne la bio-écologie et le comportement du vecteur, il ressort de nos travaux que *An. gambiae* a une tendance fortement endophile et endophage favorable à la mise en œuvre de la stratégie PID.

Impact des interventions de lutte sur la transmission du paludisme

Le taux d'endophilie a connu une diminution spectaculaire après les interventions de la PID et de la distribution gratuite des MIILDs. Cette baisse du taux d'endophilie est justifiée par une atmosphère désagréable créée par la présence de bendiocarb sur les murs intérieurs des maisons et la pose des MIILDs à l'intérieur des chambres. Ces résultats sont en désaccord avec le très faible effet excito-répulsif noté pour le bendiocarb en cases expérimentales (Akogbéto *et al.*, 2010). En revanche, Siegert *et al.*, (2009) ont montré que la fréquence de pose des anophèles sur des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes était très différente selon l'insecticide utilisé et fortement en défaveur des insecticides les plus excito-répulsifs. Malgré cet effet excito-répulsif des insecticides, une proportion non négligeable de *An. gambiae* ont accès à leur hôte pour prélever du sang avant de se reposer sur les supports imprégnés ou chercher à s'échapper. Mais une fois posée sur les supports, ces moustiques s'intoxiquent. Par ailleurs, il est apparu que la PID a modifié le comportement des populations de *An.gambiae*, traduit par la réduction des piqûres à l'intérieur des chambres traitées. Cette modification de comportement a également été observée avec les MIILDs. Ces résultats sont

compatibles avec les études ayant montré que la PID (Akogbéto *et al.*, 2011) et les moustiquaires imprégnées d'insecticide (Lines *et al.*, 1987 ; Miller *et al.*, 1991) peuvent réduire la densité moyenne, la survie et le taux d'inoculation entomologique des populations de *An.gambiae*.

Nos résultats ont aussi révélé une réduction drastique du TIE dans les 4 communes soumises à la PID. Les réductions des indices entomologiques corroborent les observations sur la baisse de l'incidence du paludisme dans les localités de Dangbo et Adjohoun. Des résultats similaires avaient été rapportés dans deux essais réalisés au Kenya, où l'incidence du paludisme a été divisée par plus de 20 dans les zones sous pulvérisation intradomiciliaire par rapport aux chiffres précédant l'intervention et aux données des zones témoins. Toutefois la PID est chère et lourde et ne peut pas être mise en œuvre partout. Elle doit être réservée seulement pour les zones où la transmission du paludisme est élevée. Paradoxalement, dans les zones où le TIE est très élevé, une réduction de 90% n'est pas suffisante pour significativement réduire la prévalence du paludisme (Trape, 2000 ; Akogbéto *et al.*, 2011). Dans les zones où les populations ont bénéficié d'une distribution gratuite des MIILDs, la réduction du TIE a été également observée. La couverture complète des moustiquaires imprégnées a été le principal facteur de cette réduction. Largement utilisés, les MIILDs peuvent être un moyen efficace de contrôle des vecteurs (Mouchet, 1991 ; Robert et Carnevale 1991; Lengeler *et al.*, 1996) et de réduction de la mortalité due au paludisme (Lengeler, 2005). En dépit de la résistance aux pyréthrinoïdes, les moustiquaires imprégnées confèrent une protection individuelle justifiée par le rôle de barrière mécanique joué par cet Outil (Curtis *et al.*, 1998). En revanche, la baisse du TIE à 0,09pi/h/n (32,94 pi/h/an) dans la zone MIILD de Sèmè n' pas suffit pour baisser l'incidence du paludisme grave. Trape *et al.*, (2000) considèrent que les moustiquaires imprégnées seront durablement efficaces lorsqu'elles seront capables d' abaisser l'exposition individuelle des personnes protégées à moins de deux piqûres d'anophèles infectés par personne par an. Selon plusieurs auteurs (Trape et Rogier, 1996; Molineaux, 1997 ; Akogbéto *et al.*, 2011), c'est seulement dans ces conditions qu'on obtiendra une diminution durable et significative du nombre d'accès de paludisme dans la population. Graham *et al.*, (2005) ont recommandé que les performances des moustiquaires imprégnées soient surveillés dans une utilisation quotidienne tout au long de la durée de vie de la moustiquaire dans différents contextes culturels afin d'évaluer sa durabilité et leur efficacité à long terme.

Impact des interventions de lutte sur la sensibilité de *An. gambiae* aux insecticides

Il ressort de nos investigations que *An.gambiae* est demeuré sensible au bendiocarb 2 ans après la pulvérisation intradomiciliaire. Cette sensibilité de la population de moustiques au bendiocarb est en accord avec des études précédentes menées au Bénin (Akogbéto et Yacoubou, 1999 ; Djogbénou *et al.*, 2009 ; Padonou *et al.*, 2011b) et dans l'île de Bioko, où le nombre de *An. gambiae s.s.* capturés à l'aide des pièges fenêtres a été considérablement réduit (Kleinschmidt *et al.*, 2009). L'augmentation globale de la résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique notée depuis quelques années et décrites par Ranson *et al.*, (2011) s'est traduite par l'apparition pour la première fois de la résistance à la deltaméthrine dans les zones d'interventions et les localités témoins n'ayant bénéficié d'aucune intervention. Elle se justifie par d'autres facteurs autres que la PID et les MIILDs. En effet les pesticides utilisés de manière intensive dans l'agriculture contre les ravageurs sont à la base de la sélection d'individus résistants. L'augmentation des doses appliquées et la diversification non contrôlée de ces insecticides utilisés dans l'agriculture et dans les ménages pour lutter contre les moustiques, sont à la base de contaminations importantes des sols et des nappes aquifères. Ces mêmes facteurs justifient l'apparition d'individus hétérozygotes de la mutation *ace-1^R*, dans les zones témoins sans intervention et éloignés des zones traitées. L'absence d'individus homozygotes RR pour la mutation *ace-1^R*, malgré ces facteurs sélectifs pourrait se justifier par le coût de la résistance. D'après Weill *et al.*, (2003), les moustiques acétylcholinestérase résistants meurent plus jeunes que les moustiques dépourvus de mutations, se développent plus lentement et sont facilement capturés par des prédateurs. Il apparaît que les facteurs qui sélectionnent la résistance et favorisent sa propagation sont nombreux et liés à la fois aux comportements de l'homme et à la bio-écologie du vecteur.

2- Conclusion générale et perspectives

La stratégie d'utilisation du bendiocarb en PID contre *An gambiae* résistant aux pyréthrinoïdes a été prometteuse. C'est pourquoi les partenaires financiers et le PNLP ont décidé de poursuivre la mise en œuvre de la stratégie dans d'autres régions du Bénin. A l'heure actuelle, une autre campagne est lancée dans le département de l'Atacora au nord du Bénin. Mais, face au déploiement actuel de plus de 4 millions de moustiquaires imprégnés de pyréthrinoïdes, à l'utilisation massive des spirales et des bombes insecticides pour l'usage domestique, puis à l'utilisation de grandes quantités d'insecticides pour la culture cotonnière

et maraîchère, des questions se posent. Quelle est la part des insecticides utilisés en santé publique d'une part, celle des insecticides utilisés en agriculture d'autre part dans la sélection de la résistance de *An. gambiae* aux insecticides? Quelle serait l'importance de l'effet additif de ces facteurs sur la sélection de la résistance chez *An. gambiae*? La solution pourrait être l'utilisation de nouveaux produits alternatifs possédant des modes d'action différents de ceux couramment employés dans le but d'une gestion raisonnée de la résistance aux insecticides. Cela permettra de retarder l'apparition et la dispersion des gènes de résistance. Cela suppose qu'il est impérieux de mettre en place une stratégie impliquant tous les acteurs du secteur industriel, de la santé et de l'agriculture. Actuellement, on ne peut plus ignorer que le choix, la sélectivité, le mode d'action et d'application d'un insecticide sont déterminants au regard du succès ou de l'échec d'une campagne de lutte. La lutte antivectorielle ne fait désormais plus appel à une seule technique mais elle intègre une somme de connaissances (Darriet, 1998). De nouvelles familles d'insecticides tels que les pyroles (N'Guessan et al 2007) et/ou les champignons entomopathogènes (Blanford *et al.*, 2005, Scholte *et al.*, 2005) ont donné des résultats prometteurs. A moyen terme, il faudra compter sur la lutte génétique (Beaty, 2000). La lutte antivectorielle fait aussi appel à des méthodes de lutte physique (drainage et assèchement des marais) qui devraient être systématiquement pris en compte dans les programmes d'aménagement et de mise en valeur des territoires. Les contraintes anthropologiques liées à l'utilisation adéquate des outils de lutte impliquent que les programmes d'enseignement des écoles, lycées et collèges consacrent une part importante à ce volet.

La lutte antivectorielle est une question de stratégie qui doit être adaptée aux conditions des communautés locales. Malgré son succès, la PID à base de bendiocarb ne doit pas être considérée comme une stratégie unique pour lutter contre *An. gambiae* résistant aux pyréthrinoides. Dans l'attente d'un vaccin, il va falloir poursuivre les recherches en envisageant toutes les pistes soucieuses d'un développement humain durable et respectueux de l'environnement. Pour cela, les communautés scientifiques doivent associer les compétences multidisciplinaires pour relever les prochains défis de mise en œuvre de nouvelles stratégies innovantes de gestion de la résistance aux médicaments antipaludiques et aux insecticides. Le remplacement du bendiocarb par une autre molécule devrait être à court terme un défi pour le PNLP, dans la mesure où les caractéristiques épidémiologiques d'une maladie transmise par un vecteur ne sont pas les mêmes selon les régions, les climats, le relief et le comportement des communautés villageoises et urbaines (Darriet, 1998).

Références bibliographiques

1. ADJA A. M., N'GORAN K. E., KENGUE P., KOUDOU G. B., TOURE M., KOFFI A. A., TIA. E., FONTENILLE D., CHANDRE F. Transmission vectorielle du paludisme en savane arborée à Gansé en Côte d'Ivoire. *Med Trop*, 2000, 66, 449-455.
2. AGYEONG I. A, MANDERSON L. Mosquito avoidance and bed net use in the Greater Accra Region, Ghana. *J Bioso Sci*, 31, 79-92.
3. AKOGBETO M. Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin. Thèse de Doctorat ès-sciences. *Université de Paris XI*, 1992, 192 pp.
4. AKOGBETO M., CHIPPAUX J. P, COLUZZI M. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin). *Rev Epidemiol Sante Publique*, 1992, 40, 233-239.
5. AKOGBETO M., DI DECO M.A. Répartition des membres du complexe *Anopheles gambiae* et de leurs variants chromosomiques au Bénin et au Togo, Afrique occidentale. *J Afric Zoology* 1995, 109, 443-54.
6. AKOGBETO M., ROMANO R. Infectivity of *Anopheles melas* vis-a-vis *Plasmodium falciparum* in the coastal lagoon area of Benin. *Bull Soc Pathol Exot* 1999, 92, 443-54.
7. AKOGBETO M., YAKOUBOU S. Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, 2, 123-130.
8. AKOGBETO M. C., DJOUAKA R. F., KINDE-GAZARD D. A. Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malar J*, 2006, 5, 22.
9. AKOGBETO M. C., PADONOU G. G., GBENOU D., IRISH S., YADOLETON A : Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J* 2010, 9, 204.
10. AKOGBETO M., PADONOU G. G., BANKOLE H.S., GAZARD D.K., GBEDJISSI G.L. Dramatic Decrease in Malaria Transmission after Large-Scale Indoor Residual Spraying with Bendiocarb in Benin, an Area of High Resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 85(4), 586-93.
11. ALBOUY-LLATY M. Techniques d'échantillonnage en épidémiologie. *Université de Poitiers*, 2009, 48 pp.
12. ANDERSON N., HOBO L. Sociologie des sans-abris. *Paris, Nathan*. 1993.
13. ANSARI M. A., RAZDAN R. K. Impact of residual spraying of bendiocarb against the malaria vector *Anopheles culicifaces* in selected villages of the Ghaziabad District, Uttar Pradesh, India. *J Am Mosq Control Assoc*, 2004, 20 (4), 418-23.

14. ANTHONY D.W., SAVAGE K.E., HAZARD E.I., AVERY S.W., BOSTON M.D., OLDACRE S.W. Field tests with *Nosema algerae* Vavra and Undeen (Microsporidia, Nosematidae) against *Anopheles albimanus* Weidmann in Panama. *Misc Publ entomol Soc Am*, 1978,11, 17-28.
15. ARREDONDO J. I, BOW D.N, VACA M. A . Effect of indoor residual spraying of DDT and bendiocarb on the feeding patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico . *J Am Mosq Control Assoc*, 1990, 6, 635 – 640.
16. ASIDI, A. N., N'GUESSAN R., KOFFI A. A., CURTIS C. F., HOUGARD J. M., CHANDRE F., CORBEL V., DARRIET F., ZAIM M., ROWLAND M.W. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyriphos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 2005, 4, 25.
17. ASINAS C. Y, HUGO C.T., BOASE C.J., EVANS R.G. Evaluation of selective spraying of bendiocarb (Ficam VC) for the control of *Anopheles flavirostris* in the Philippines . *J Am Mosq Control Assoc*, 1994 . 10, 496 – 500 .
18. ATANGANA J., FONDJO E., FOMENA A., TAMESSE L.J., PATCHOKÉ S., NDJEMAI M. N., HAMADOU N. M. N., PROSPER A. B. N. Seasonal variation of malaria transmission in Western Cameroon highlands: Entomological and clinical investigations. *J Cell Anim Biol*, 2009, 3, 033-038.
19. ATIELI F. K., MUNGA S. O., OFULLA A.V., VULULE J. M. The effect of repeated washing of long lasting insecticide-treated nets (LLINs) on the feeding success and survival rates of *Anopheles gambiae*. *Malar J*, 2010, 9, 304.
20. AYAD H., GEORGHIOU G. P. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *J Econ Ent*, 1975, 68, 295-297.
21. BADOLO A., ILBOUDO-SANOGO E., OUEDRAOGO A. P., COSTANTINI C. Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Trop Med Int Health*, 2004, 9, 330-4.
22. BEATY BARRY J. Genetic manipulation of vectors: a potential novel approach for control of vector-borne diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (19), 10295-10297.
23. BERZOSA P.J, CANO J., ROCHE J., RUBIA J. M., GARCIA L., MOYANO E., GUERRA A., MATEOS J. C., PETRACA V., DO ROSARIA V., BENITO A. Malaria

- vectors in Bioko island (Equatorial Guinea): PCR determination of the members of *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae) and pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in *An. gambiae* sensu stricto. *J Vector Ecology*, 2002, 27, 102-106.
24. BINKA F. N., KUBAJE A., ADJUIK M., WILLIAMS L. A., LENGELE R. C., MAUDE G. H., ARMAH B., KAJIHARA J., ADIAMAH H., SMITH P. G. Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena- Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop. Med. Int. Health*, 1996, 1, 147-54.
 25. BINKA F.N., ADONGO P. Acceptability and use of insecticide impregnated bednets in northern Ghana. *Trop. Med. Int. Health*, 1997, 2, 499-507.
 26. BLANFORD S., CHAN B. H., JENKINS N., SIM D., TURNER R. J., READ A. F., THOMAS M. B. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 2005, 308 (5728), 1638-41.
 27. BROWN A., PAL R. Insecticide resistance in arthropods. *W.H.O. Geneva*, 1971.
 28. CARNEVALE P., ROBERT V., BOUDIN C., HALNA J-M., PAZART L., GAZIN P., RICHARD A., MOUCHET J. La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes au Burkina Faso. *Bull Soc Path E.*, 1988, 81, 832-846.
 29. CARNEVALE P., MOUCHET J. Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Med Trop*, 1990, 50 : 391-398.
 30. CARNEVALE P. La lutte antivectorielle, perspectives et réalités. *Med Trop*, 1995, 55, 56-65.
 31. CHANDRE F. Résistance d'*Anopheles gambiae* Giles et de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles. Thèse de Doctorat. *Université de Paris XII*, 1998, 112 pp.
 32. CHANDRE F., DARRIET F., MANGA L., AKOGBETO M., FAYE O. Status of pyrethroid résistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bull Org mond santé*, 1999, 77, 230-234.
 33. CLAYTON J. Scientists plan field tests for GM mosquitoes. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6, 191-2
 34. COLLINS F.H. Prospects for Malaria Control through the Genetic Manipulation of its Vectors. *Parasitol Today*, 1994, 10, 370-371.
 35. COLLINS F. H., PASKEWITZ S. M. Malaria: current and future prospects for control. *Annu Rev Entomol*, 1995, 40. 195-219.
 36. COLLINS F.H., SAKAI R.K., VERVICK K.D., PASKEWITZ S., SEELEY D. C., MILLER L.H., COLLINS W.E., CAMPBELL C.C., GWADZ R.W. Genetic selection of

- a plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci*, 1986, 236, 607-610.
37. COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V., DI DECO M. A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1979, 73, 483-497.
38. COMORO C., NSIMBA S. E. D., WARSAME M., THOMSON G. Local understanding, perceptions and reported practices of mothers/guardians and health workers on childhood malaria in Tanzania: Implications for malaria control. *Acta Trop*, 2003, 87, 305-313.
39. COOSEMANS M. Lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique tropicale. Laboratoire d'Entomologie du Centre Muraz. Bodo-Dioulasso (Haute-Volta). *Méd Trop*, 1978 ,38, No h.
40. COOSEMANS M., SALES S. Evaluation au stade IV du malathion, bendiocarb et décambéthrine pour lutter contre les Anophèles – Rémanence de la perméthrine et d'un analogue biodégradable du DDT. *Bobo-Dioulasso, O.R.S.T.O.M., Doc Techn*, 1978, 6, 657, 30 pp.
41. COOSEMANS M. Comparaison de l'endémie malarienne dans une zone de riziculture et dans une zone de culture de coton dans la plaine de la Rusizi, Burundi. *Ann Soc belge Med trop*, 1985, 65, 187-200.
42. CORBEL V., CHANDRE F., BRENGUES C., AKOGBÉTO M., LARDEUX F., Hougard J. M., GUILLET P. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J*, 2004, 3 (1), 22.
43. CORBEL V., N'GUESSAN R., BRENGUES C., CHANDRE F., DJOGBENOU L., MARTIN T., AKOGBETO M., Hougard J. M., ROWLAND M. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*, 2007, 101, 207-16.
44. COSTANTINI C., BADOLLO A., ILBOUDO-SANOGO E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004, 98, 644-52.
45. COZ J., DAVIDSON G., CHAUVET G., HAMON J. La résistance des anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et à Madagascar. *Cah ORSTOM, Sér Ent Méd Parasitol*, 1968, 38 :14.

46. CRAMPTON J. M., COMLEY I., EGGLESTON P., HILL S., HUGUES M., KNAPP T., LYCEIT G., URWIN R., WARREN A. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1992, 87 (3), 43-49.
47. CURTIS C.F. The case for Malaria Control by Genetic Manipulation of its Vectors. *Parasitol Today*, 1994, 10, 371-374.
48. CURTIS C. F., MAXWELL C.A., FINCH R.J., NJUNWA K. J. A comparison of use of a pyrethroid either for house spraying or for bednet treatment against malaria vectors. *Trop Med Int Health*, 1998, 3, 619 – 631.
49. CURTIS C., MNZAVA A. E. P. Lutte antipaludique : comparaison entre les pulvérisations domiciliaires et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide. *Bull Org mond santé*, 2001, 4, 145-156.
50. CZEHER C., LABBO R., ARZIKA I., DUCHEMIN J.B. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J*, 2008, 7, 189.
51. DABIRE K.R, DIABATE A., NAMONTOUGOU M., DJOGBENOU L., KENGNE P., SIMARD F., BASS C., BALDET T. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso (West Africa). *Trop Med Int Health*, 2009, 14, 396-403.
52. D'ALESSANDRO U., OLALEYE B., LANGEROCK P., BENNETT S., CHAM K., CHAM B., GREENWOOD B. The Gambian National Impregnated Bed Net Programme: evaluation of effectiveness by means of case-control studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, 91, 638-642.
53. D'ALESSANDRO U., OLALEYE B., MCGUIRE W., LANGEROCK P., BENNETT S., AIKINS M., THOMSON M., CHAM M., CHAM B., GREENWOOD B. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet*, 1995, 345, 479-83.
54. DAMIEN G.B , DJÈNONTIN A., ROGIER C., CORBEL V., BIO-BANGANA S., CHANDRE F., AKOGBÉTO M., KINDÉ-GAZARD D., MASSOUGBODJI A., HENRY MC. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin . *Malar J*, 2010, 9, 380 .
55. DAVIDSON G. Insecticide résistance in *Anopheles gambiae* GILES: a case of simple Mendelian inheritance. *Nature*, London, 1956, 178, 863-863.
56. DAVIDSON G., HAMON J. A case of dominant dieldrine resistance in *Anopheles gambiae* GILES. *Nature*, 1962, 196, 1012 .

57. DARRIET F. Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyréthrinoïdes dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia*, 1991, 33, 111-119.
58. DARRIET F. La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies. *Editions Karthala*, 1998, 111 pp.
59. DARRIET F., ROBERT V., VIEN N .T., CARNEVALE P. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. *OMS*, 1984, 899, 20 pp.
60. DELLA TORRE A., FANELLO C., AKOGBETO M., DOSSOU-YOVO J., FAVIA G., PETRARCA V., COLUZZI M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol*, 2001, 10, 9-18.
61. DEMING M. S., GAYIBOR A., MURPHY K., JONES TS., KARSA T. Home treatment of febrile children with antimalarial drugs in Togo. *Bull WHO*, 1989, 67, 695- 700.
62. DETINOVA T.S Méthode à appliquer pour classer par groupe d'âge les diptères présentant une importance médicale. *Org Mond Santé Sér Mono*, 1963, 47.
63. DIABATE A. Evaluation de la résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoïdes au Burkina Faso.Thèse de 3^e cycle, *Université de Ouagadougou*, 1999. 128 pages.
64. DJEGBE I., BOUSSARI O., SIDICK A., MARTIN T., RANSON H., CHANDRE F., AKOGBETO M., CORBEL V. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J*, 2011, 10, 261.
65. DJÈNONTIN A., BIO-BANGANA S., MOIROUX N., HENRY M.C., BOUSARI O., CHABI J., OSSÈ R., KOUDÉNOUKPO S., CORBEL V., AKOGBÉTO M., CHANDRE F. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors*, 2010, 3, 83.
66. DJÈNONTIN A., CHABI J., BALDET T., IRISH S., PENNETIER C., HOUGARD J. M., CORBEL V., AKOGBÉTO M., CHANDRE F. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J*, 2009, 8, 233.
67. DJOBENOU L., DABIRE R., DIABATE A., KENGNE P., AKOGBÉTO M., HOUGARD J. M., CHANDRE F. Identification and geographic distribution of the *ace 1R* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78 (2), 298-302.

68. DJOGBENOU L., NOEL V., AGNEW P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J*, 2010, 9, 12.
69. DOANNIO J.M.C., KONAN Y., AMALAMAN K., ATTIAH J. Connaissances, attitudes et pratiques des populations vis-à-vis des moustiques dans la zone urbaine et périurbaine de Bouaké et dans les villages de Kafiné et de Kabolo (Côte-d'Ivoire, Afrique de l'Ouest). *Bull Soc Pathol Exot*, 2004. 97(4), 295-301.
70. DOSSOU-YOVO J., DOANNIO J. M.-C, DIARRASSOUBA S., CHAUVANCY G. Impact d'aménagements de rizières sur la transmission du paludisme dans la ville de Bouaké, Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, 91, 327-333.
71. DUCHEMIN J B., TSY J M, RABARISON P., ROUX J., COLUZZI M., COSTANTINI C. Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Med Vet Entomol*, 2001, 15, 50–57.
72. ELISSA N, MOUCHET J, RIVIERE F, et al. – Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 1993, **73**, 291-294.
73. ETANG J., NWANE P., MBIDA J. A., PIAMEU M., MANGA B., SOUOP D., AWONO-AMBENE P. Variations of insecticide residual bioefficacy on different types of walls: results from a community-based trial in south Cameroon. *Malar J*, 2011, 10, 333.
74. FAO/OMS. Données et recommandations de la réunion mixte sur les résidus de pesticides tenue à Rome du 23 novembre au 2 décembre 1982. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome*, 1983, 49.
75. FARNHAM A. W. Genetics of resistance of pyrethroid selected houseflies, *Musca domestica* L. Pestid. *Sci*, 1973, 4, 513-520.
76. FAVIA G., DELLA TORRE A., BAGAYOKO M., LANFRANCOTTI , SAGNON N. F, TOURE Y, COLUZZI M. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol*, 1997, 6, 377-383.
77. FAYE O. L'Aspersion Intra Domiciliaire dans la lutte contre le paludisme. Rapport d'activités. *Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal*, 2007, 4 pp.
78. FAYE O., KONATE L., MOUCHET J., FONTENILLE D., SY N., HEBRARD G., HERVE J. P. Indoor resting by outdoor biting females of *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in the sahel of northern Senegal. *J Med Entomol*, 1997, 34, 285-289.

79. FEACHEM R., PHILIPPS A. A. Malaria: 2 years in the fast lane. *Lancet*, 2009, 373, 1409-1411.
80. FEDERICI B.A., Viral pathogens. *J Am Mosq Control Assoc*, 1985, 6, 62-74.
81. FETTENE M., BALKEW M., GIMBLET C. Utilization, retention and bio-efficacy studies of PermaNet in selected villages in Buie and Fentalie districts of Ethiopia. *Malar J*. 2009, 8, 114.
82. GENTILINI M., CAUMES E., DANIS M., MOUCHET J., DUFLO B., LAGARDERE B., RICHARD-LENOBLE D., BRUCKER G. Médecine tropicale. *Edition Flammarion, Paris*, 1993, 906 pp.
83. GEORGHIOU G. P., TAYLOR C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol*, 1977, 70: 319-23.
84. GHOSH A, EDWARDS MJ, JACOBS-LORENA M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*, 2000, 16 (5), 196- 201.
85. GILLIES M.T, DE MEILLON B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *South Afr Inst Med Res Johannesburg*, 1968, 54, 1-343.
86. GRAHAM K., KAYEDI M.H, MAXWELL C., KAUR H., REHMAN H., MALIMA R., CURTIS C.F, LINES J.D, ROWLAND M.W. Multi-country field trials comparing wash-resistance of PermaNet and conventionally insecticide-treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. *Med Vet Entomol*, 2005, 29, 72-83.
87. GRATZ N. G. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol*, 1999, 44, 51-75.
88. HAMON J. Contribution à l'étude des Culicidés de la région de Porto- Novo (Bas-Dahomey). *Ann parasitologie*, 1954, 29, 588-594.
89. HARBACH R.E. The classification of genus Anopheles (Diptera : Culicidae) : a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Ent Res*, 2004, 94, 537-553.
90. HARGREAVES K, KOEKEMOER LL, BROOKE B, HUNT RH, MTHEMBU J, COETZEE M: *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 2000, 14:181-189.
91. HOUGARD J. M. Chemical insecticides for lymphatic filariasis vectors and the role of impregnated bednets. *Doc miméo, OMS, FIL/EC/91/ WP*, 1991, 18,7 pp
92. HOUGARD J.M. Lutte biologique contre les vecteurs. *Bull Soc Fr Parasitol*, 1992, 2.
93. HOUGARD J. M., POUDIOUGO P., GUILLET P., BACK C., AKPOBOUA L. K. B., QUILÉVÉRÉ D. Criteria for the selection of larvicides by the onchocerciasis control programme in West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*, 1993, 85, 435-442.

94. HOWARD S.C, OMUMBO J., NEVILL C., SOME E.S, DONNELLY C.A., SNOW R.W. Evidence for a mass community effect of insecticide-treated bednets on the incidence of malaria on the Kenyan coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000, 94,(4),357-60.
95. HUMPHERY-SMITH I., GRULET O., CHATEL C. Pathogenicity of *Spiroplasma taiwanense* for larval *Aedes aegypti* mosquitoes. *Med Vet Entomol*, 1991, 5, 229-232.
96. HUNT R. H., COETZEE M., FETTENE M. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, 92, 231-235.
97. HUTTEL J. Note sur la répartition des moustiques dans le Bas- Dahomey. *Bull Soc Pathol Exot*, 1950, 43, 563-566.
98. IGUN U.A. Why we seek treatment here: retail pharmacy and clinical practice in Maiduguri, Nigeria. *Soc Sci Med*, 1987, 24, 689.
99. INSAE. Fichier village Ouémé. Mai, 2004, 29 pp.
100. JONCOUR G. *Lutte anti-palustre au Dahomey*. MPS, 1959, 13.
101. JONES A.E., WORT U.U, MORSE A.P., HASTINGS I.M., GAGNON A.S. Climate prediction of El Niño malaria epidemics in north-west Tanzania. *Malar J*, 2007, 6, 162.
102. KETTLE D. S. Medical and veterinary entomology. *CAB International Wallington UK*, 1995.
103. KINUNG'HI S.M., MASHAURI F., MWANGA J.R., NNKO S.E., KAATANO G.M., MALIMA R., KISHAMAWE C., MAGESA S., MBOERA L.E.G. Knowledge, attitudes and practices about malaria among communities: comparing epidemic and non-epidemic prone communities of Muleba district, North-western Tanzania." *BMC Public Health*, 2010, 10: 395.
104. KISZEWSKI A., MELLINGER A., SPIELMAN, MALANEY P., SACHS E., SACHS J. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 70, 486-98.
105. KOLACZINSKI J. H., FANELLO C., HERVE J. P., CONWAY D. J., CARNEVALE P., CURTIS C. F. Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bull Entomol Res*, 2000, 90: 125-132.
106. KRUEGER R. Focus Groups. A practical guide for applied research. *Thousand Oaks: Sage*, 1994, 255pp.
107. KULKARNI M.A, MALIMA R., MOSHA F.W., MSANGI S., MREMA E. Efficacy of pyrethroidtreated nets against malaria vectors and nuisance- biting mosquitoes in

- Tanzania in areas with long-term insecticide-treated net use. *Trop Med Int Health*, 2007, 12, 1061- 1073.
108. KURTAK D. C. Maintenance of effective control of *Simulium damnosum* in the face of insecticide resistance. *Acta Leiden*, 1990, 59, 95-112.
 109. KYAWT-KYAWT S.W.E., ALAN P. Knowledge, attitudes and practices with regard to malaria control in an endemic rural area of Myanmar. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*, 2004, 35, 53-62.
 110. LABBÉ P, BERTHOMIEU A, BERTICAT C, ALOUT H, RAYMOND M, LENORMAND T, WEILL M :Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(4),1056-1067
 111. LACEY L. A. Viral pathogens of vector Nematocera and their potential for microbial control. *Proc 3rd Int Coll Invertebr Pathol Univ Sussex, Brighton, UK*, 1982, 428-436.
 112. LAYNE SP. Principles of infectious disease epidemiology. *Epi*, 2005, 220.
 113. LE BRAS J. Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum*. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, 92, 236-241.
 114. LENGELE C. Insecticide Treated Bednets and Curtains for Malaria Control: A Cochrane Review. *The Cochrane Library, Issue 3 Oxford, United Kingdom: Oxford Update Software Ltd*, 2005.
 115. LENGELE C., CATTANI J, DE SAVIGNY D. Net Gain, a New Method for Preventing Malaria Deaths. *Geneva: International Development Research Center/WHO*, 1996.
 116. LINES J.D. Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes, a look at the evidence. *Parasitol Today* 1988, 4, 17-20.
 117. LINES J.D., MYAMBA J., CURTIS C.F. Experimental hut trials of permethrin impregnated mosquito nets and eave curtains against malaria vectors in Tanzania. *Med Vet Entomol* 1987, 1:37-51.
 118. LI ZUZI., XU J, LI B, ZHU T., LI MINGXIN, Mosquito nets impregnated with deltamethrin against malaria vectors in China. *Doc. Miméo, OMS*, 1987, WHO/VBC/ 87 939.
 119. LUNDWALL, E., PENNETIER, C., CORBEL, V., DE GENTILE, L., LEGROS, F. Malaria: what about exposure prophylaxis?. *Rev Pra*, 2005, 55, 841-8
 120. LYIMO IN, FERGUSON HM: Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol*, 2009, 25,189-196.

121. MAC DONALD G. Epidemiological basis of malaria control-Bull. *Org Mond Santé*, 1956, 15, 613-626.
122. MAGNIN M., FOURNIER D., PASTEUR N. Mécanismes physiologiques de la résistance des insectes aux insecticides. Cah. ORSTOM, Ent Méd Parasitol, 1985, 13 (4), 273-280.
123. MAHARAJ R., CASIMIRO S., MTHEMBU S.D, SHARP B.L. The residual life of bendiocarb: a field-based evaluation from Mozambique. *J Med Entomol*, 2004, 41(1), 130-2.
124. MARTINEZ-TORRES D, CHANDRE F, WILLIAMSON MS, DARRIET F, BERGÉ JB, DEVONSHIRE AL, GUILLET P, PASTEUR N, PAURON D: Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 1998, 7, 179-184.
125. MAZIER D. Cycle et biologie des plasmodiums. Paludisme. *Universités francophones*, Edition Marketing Ellipses, 1991, 25-33.
126. MCCABE, E. T., BARTHEL, W. F., GERTLER, S. I., HALL, S. A. (1954) Insect repellents, III, N, N-diethylamides. *J Org Chem* 19: 493
127. MILLER J.E, LINDSAY S.W, ARMSTRONG J.R. Experimental hut trials of bednets impregnated with synthetic pyrethroid or organophosphate insecticide for mosquito control in The Gambia. *Med Vet Entomol*, 1991, 5, 465-476.
128. MINISTÈRE DE LA SANTE DE LA REPUBLIQUE DU BENIN. Annuaire des statistiques sanitaires SNIGS/DPP/MS, 2007, 248 pp.
129. MOLINEAUX L. Nature's experiment: what implications for malaria prevention. *Lancet*, 1997, 349, 1636-1637.
130. MOUCHET J. Pyrethroid impregnated bed nets in malaria control strategy at community level . *Acta Trop*, 1991, 46, 267 -268.
131. MOUCHET J., GARIOU J. Exophilie et exophagie d'*Anopheles gambiae* Giles 1902, dans le sud Cameroun. *Bull Soc Pathol Exot*, 1957, 3, 446-461.
132. MPOFU S.M., KANYIMO K.H., MASENDU H. Potential use of bendiocarb (Ficam VC) for malaria control in an area of Zimbabwe. *J Am Mosq Control Assoc*, 1991, 7(4), 536-42.
133. MULLEN G., DURDEN L. Medical and Veterinary Entomology, *Academic Press*, 2002.
134. NAJERA, J. A., ZAIM, M. Lutte contre les vecteurs du paludisme. Critères et procédures de prise de décision pour une utilisation raisonnée des insecticides. *OMS, Genève*, 2004.

135. NAKAHASHI T. Resistance to insecticides due to reduced insensitivity of the nervous system: 333-352, in Pest resistance to pesticides: challenges and prospects (G. P. Georghiou et T. Saito, eds.). *Plenum Press, New York*, 1983.
136. NATIONS UNIES. Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses : Réglement type, 10e révision. *New York, Nations Unies*, 2002.
137. NENTWIG G. Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitol Res*, 2003, 90 (1) S40-8.
138. NEVILL C.G., SOME E.S., MUNG'ALA V.O., MUTEMI W., NEW L., MARSH K., LENGELE R., SNOW R.W. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health*, 1996, 1, 139-146.
139. N'GUESSAN R., CORBEL V., AKOGBETO M., ROWLAND M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Bénin. *Emerg Infect Dis*. 2007, 13(2), 199-206.
140. N'GUESSAN R., KNOLS B.J., PENNETIER C., ROWLAND M.W. Deet microencapsulation: a slow release formulation enhancing the residual efficacy of bednets against malaria vectors. *Trans Roy Soc trop Med Hyg*, 2008, 102, 259-262.
141. NICOLAS L., DOSSOU-YOVO J., Hougard J.M. Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 25, 341 -345. 262.
142. OKEKE TA., OKAFOR H.U. Perception and treatment seeking Behavior for Malaria in Rural Nigeria: Implications for Control. *J Hum Ecol*, 2008, 24, 215-222.
143. OKIRO E.A, ALEGANA V.A, NOOR A.M, SNOW R.W. Changing malaria intervention coverage, transmission and hospitalization in Kenya. *Malar J*, 2010, 9, 285.
144. O'MALLEY C. Seven ways to a succesful dipping carrier. *Wing beats*, 1995, 6, 23-4
145. O'MEARA W.P, BEJON P., MWANGI T.W., OKIRO E.A., PESHU N., SNOW R.W., NEWTON C.R., MARSH K. Effect of a fall in malaria transmission on morbidity and mortality in Kilifi, Kenya. *Lancet*, 2008, 372, 1555–1562.
146. OMER S.M., GEORGHIOU G.P., IRVING S.N. DDT/pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. *Mosq News*, 1980, 40, 200–209.
147. OMS. 7^e rapport du comité d'Experts des insecticides. *Organisation mondiale de la Santé, Genève, Sér rapp Tech*, 1957.
148. OMS. Le Rapport sur le Paludisme en Afrique. *Organisation mondiale de la Santé/UNICEF* 2003, 120 pp.

149. OMS. Manuel pour l'évaluation et la déclaration des épidémies de paludisme sur le terrain. *WHO/HTM/MAL/2004.1097*.
150. OMS. Les Associations Thérapeutiques à base d'Artémisinine (ACT). *Genève 2, Suisse, 2005.* Site web: <http://www.who.int/malaria>
151. OPPENOORTH F. J. Biochemistry and Physiology of Resistance. *Comprehensive Insect Physiology Biochem Pharmacol*, 1985, 731-773.
152. PADONOU G. Evaluation en cases expérimentales de l'efficacité de quelques insecticides pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamate en pulvérisation intradomiciliaire. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master d'entomologie appliquée. Faculté des Sciences et Techniques. *Université d'Abomey Calavi*, 2008, 25 pp.
153. PADONOU G. G., GBÉDJISSI G. L., BANKOLÉ H. S., NOUKPO H., YADOULÉTON A., AKOGBÉTO M.C. Studying physical and sociological environment of malaria to implement an indoor insecticide spraying campaign in Oueme region, Benin. *J Public Health Epidemiol*, 2011 (a) 3 (13), 622-631.
154. PADONOU G. G, SEZONLIN M., GBEDJISSI G. L., AYI I., AZONDEKON R., DJENONTIN A., BIO-BANGANA S., OUSSOU O., YADOLETON A., BOAKYE D., AKOGBETO M. Biology of *Anopheles gambiae* and insecticide resistance: Entomological study for a large scale of indoor residual spraying in South East Benin. *J Parasitol Vector Biol*, 2011(b) , 3(4), 59-68.
155. PAURON D., BARHANIN J., AMICHOT M., PRALAVORIO M., BERGE J. B., LAZDUNSKI M. Pyrethroid receptor in insect Na⁺ channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. *Biochemistry*, 1989, 28, 1673-1677.
156. PENNETIER C., CORBEL V., HOUGARD J. M. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 2005, 72, 739-44.
157. PENNETIER C., COSTANTINI C., CORBEL V., LICCIARDI S., DABIRE R. K., LAPIED B., CHANDRE F., HOUGARD J. M. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14 (11), 1707-14.
158. PERRY A. S., HOSKINWS M. The detoxification of DDT by resistant houseflies and inhibition of this process by piperonyl cyclonene. *Sci*, 1950, 11I, 600.
159. PLEASS R.J., ARMSTRONG J.R.M., CURTIS C.F. JAWARA M., LINDSAY S.W. Comparison of permethrin treatments for bednets in The Gambia. *Bull Entomol Res*, 1993, 83, 133-140.

160. PRIESTER T.M., GEORGHIOU G.P. Cross-resistance spectrum in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Pest Sci*, 1980, 11, 617–624.
161. PROTOPOPOFF N., VERHAEGHEN K., VAN BORTEL W., ROELANTS P., MARCOTTY T., BAZA D., D'ALESSANDRO U., COOSEMANS M. A high increase in kdr in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands. *Trop Med Inter Health*, 2008, 13, 1479-1487.
162. RAKOTOMANANA F., JEANNE I., DUCHEMIN J.B., PIETRA V., RAHARIMALALA L. Approche géographique dans la lutte contre le paludisme dans la région des Hautes Terres Centrales à Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar*, 2001, 67 (1&2), 27-30.
163. RANSON H., JENSEN B., VULULE J. M., WANG X., HEMINGWAY J., COLLINS F. H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 2000, 9 (5), 491-497.
164. RANSON H., N'GUESSAN R., LINES J., MOIROUX N., NKUNI Z., CORBEL V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control *Trends Parasitol* 2011, 27, 91-98.
165. RAYMOND M., PASTEUR N., FOURNIER D., CUANY A., BERGÉ J. MAGNIN M. Le gène d'une acétylcholinestérase insensible au propoxur détermine la résistance de *Culex pipiens* à cet insecticide. *C R Acad SC Paris*, 1985, 300, 14, 509-512.
166. RAYMOND M., ROUSSET F. GENEPOP Version 1.2, a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 1995, (26), 248-249.
167. RAYMOND M, BERTICAT C, WEILL M, PASTEUR N, CHEVILLON C. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*, 2001, 112, 287-296.
168. REDDY M.R., OVERGAARD H.J., ABAGA S., REDDY V.P., CACCONE A., KISZEWSKI A.E., SLOTMAN M.A. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J*, 2011, 10, 184.
169. REIMER L.J, TRIPET F., SLOTMAN M., SPIELMAN A., FONDJO E., LANZARO G.C: An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Mol Biol*, 2005, 14, 683-688.
170. RIVIERE F., KAY B.H., KLEIN J.M., SECHAN Y. *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda) and *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* for the biologist control of *Aedes*

- and *Culex* vectors (Diptera: Culicidae) breeding in crab holes, tree holes, and artificial containers. *J Med Entomol*, 1987, 24, 425- 430.
171. ROBERT V., CARNEVALE P. Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou Valley, in Burkina Faso. *Bull World Health Org*, 1991, 69, 735 – 740.
172. ROBERT V., OUARI B., OUEDRAOGO V., CANEVALE P. La succession des espèces anophéliennes et le cycle du riz ; études écologiques des *Culicidoe* adultes et larvaires dans la riziére de la vallée du Kou, Burkina-Faso. *Acta Tropica*, 1988, 45, 351-359.
173. ROGIER C., LY A.B, TALL A., CISSE B., TRAPE J.F. *Plasmodium falciparum* clinical malaria in Dielmo, a holoendemic area in Senegal: no influence of acquired immunity on initial symptomatology and severity of malaria attacks. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60, 410-420.
174. ROHANI A., · SAADIYAH I., · WALGUN A., · LEE H. L. Laboratory study on the effect of deltamethrin WG and WP formulations against *Anopheles maculatus* Theobald (Diptera:Culicidae) on rough and smooth surfaces of bamboo wall. *Trop Biomed*, 2007, 24(2), 77-82.
175. ROJAS W., NORTHUP J., GALLO O., MONTOYA A.E., MONTOYA F., RESTREPO M., NIMNICH, ARANGO M. & ECHAVARRIA M., Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in larval *Anopheles* habitats in Colombia. *B World Health Organ*, 1987, 65(3), 331-337.
176. RUEBUSH T.K. KERN M.K., CAMPBELL C.C, OLOO A.J. Self-treatment of malaria in a rural area of Western Kenya. *Bull. WHO*, 1995, 73, 229-236.
177. RUSSELL T.L., GOVELLA N.J, AZIZI S., DRAKELEY C.J, KACHUR S.P, KILLEEN G.F. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*, 2011, 10, 80.
178. SANTAMARIA M. A. Estudio comparativo de la infestación de *Romanomemis culicivorax* (Ross Y Smith, 1976) Rhabditida Mermithidae en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 en condiciones de laboratorio. *Revista Cubana Medicina Tropica J*, 1987, 39(3), 45-48.
179. SANTOS R.L.C., DA SILVA FAYAL A., AGUIAR A.E.F., VIEIRA D.B.R., POVOA M.M. Evaluation of the residual effect of pyrethroids on *Anopheles* in the Brazilian Amazon. *Rev Saúde Pública*, 2007, 41(2).

180. SCHOLTE E. J., NG'HABI K., KIHONDA J., TAKKEN W., PAAIJMANS K., ABDULLA S., KILLEEN G. F., KNOLS B. G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Sci*, 2005, 308 (5728), 1641-2.
181. SCOTT JA., BROGDON WG., COLLINS F.H. Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 49, 520–529.
182. SECK I., FALL I.S., FAYE A., BA O., TAL-DIA A. X. Connaissances, attitudes et pratiques des femmes sur le paludisme, dans la zone rurale de Popenguine, Sénégal. *Med Trop*, 1995, 68, 629-633.
183. SELF L.S., PANT C.P. Insecticide susceptibility and resistance in population of *Anopheles gambiae*, *Culex fatigans* and *Aedes aegypti* in Southern Nigeria. *Bull OMS*, 1966, 34, 960-962.
184. SERVICE M.W. Dieldrin resistance in *Anopheles funestus* GILES from an unsprayed area in Northern Nigeria. *J Trop Med Hyg*, 1964, 67, 190.
185. SERVICE M.W., DAVIDSON G. A high incidence of dieldrin resistance in *Anopheles gambiae* GILES from an unsprayed area in Northern Nigeria. *Nature*, London, 1964, 203, 209-210.
186. SHARMA A.K., AGGARWAL O.P., CHATURVEDI S., BHASIN S.K. Is education a determinant of knowledge about malaria among Indian tribal population? *J Commun Dis*, 2003, 35, 109-17.
187. SHARP B.L., RIDL F.C., GOVENDER D., KUKLINSKI J., KLEINSCHMIDT I. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malar J*, 2007, 6, 52.
188. SHERRATT T.S., TIKASINGH E.S. A laboratory investigation of mosquito larval predation by *Toxorhynchites moctezuma* on *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol*, 1989, 3, 239-246.
189. SHEY N.D, LONGDOH N.A, FOUAMNO K.H.L, NGUEDIA A.J.C, SHEY W.C, MBOSHI N.S, KONGNYU N.A. Knowledge and practices relating to malaria in Ndu community of Cameroon: Signs and symptoms, causes and prevention. *J Public Health Epidemiol*, 2011, 3, 294-300.
190. SIEGERT P. Y., WALKER E., MILLER J. R. Differential behavioral responses of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) modulate mortality caused by pyrethroid treated bednets. *J Econ Entomol*, 2009, 102 (6), 2061-71.

191. SMISSAERT H. R. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphates. *Sci*, 1964, 143, 129-131.
192. SNOW R. W., BRADLEY A. K., HAYES R., BYASS P., GREENWOOD B. M. Does wood smoke protect against malaria?. *Ann Trop Med Parasitol*, 1987, 81, 449-51
193. SNOW R. W., GUERRA C. A., NOOR A. M., MYINT H. Y., HAY S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2005, 434 (7030), 214-7.
194. SNOW R.W., ROWAN K.M., LINDSAY S.W., GREENWOOD B.M. A trial of bed nets (mosquito nets) as a malaria control strategy in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988, 82(2), 212-5.
195. SPIELMAN A. Why Entomological Antimalarial Research should not Focus on Transgenic Mosquitos. *Parasitol Today*, 1994, 10, 374-376.
196. STUMP A.D, ATIELI F.K, VULULE J.M, BESANSKY N.J. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide- treated bed net trials. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 70, 591- 596.
197. SWEENEY A.W., BECNEL J.J. Potential of microsporidia for the biological control of mosquitoes. *Parasitol Today*, 1991, 7(8), 217-220.
198. TOBGY A. H., NASRAT G. E., NAFEI H. et EL-ABIDIN SALAM A. Z. Insecticide resistance. (V). Development of resistance to parathion in *Drosophila melanogaster* with special reference to esterases. *Egypt J Genet Cytol*, 1976, 5, 288-299.
199. TOSTA C.E. Coadaptation and malaria control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007, 702, 385-404.
200. TRAPE J-F. Contre : Les limites des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale. *Bull Soc Pathol Exot*, 2001, 94, 2 bis, 174-179.
201. TRAPE J.F., ROGIER C. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today*, 1996, 12 , 236 - 240 .
202. TRIPATHI R. K., O'BRIEN R. D. Insensitivity of acetylcholinesterase as a factor in resistance of houseflies to the organophosphate Rabon. *Pest Biochem Physiol*, 1973, 3, 495-498.
203. TRIPET F., WRIGHT J., CORNEL A., FOFANA A., MCABEE R., MENESSES C., REIMER L., SLOTMAN M., THIEMANN T., DOLO G., TRAORÉ S., LANZARO G. Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76, 81-87.

204. VARMUS H., KLAUSNER R., ZERHOUNI E., ACHARYA T., DAAR A. S., SINGER P. A. Public health. Grand Challenges in Global Health. *Sci*, 2003, 302, 398-9
205. VORMS-LE MORVAN J., VAZEILLE-FALCOZ M.C., RODHAIN F. Infection expérimentale de moustiques *Aedes albopictus* par une souche de spiroplasmes isolée de *Culex annulus B* Taiwan. *Bull Soc Path Ex*, 1991, 84, 15-24.
206. VULULE J.M, BEACH R.F, ATIELI F.K, MOUNT D.L, ROBERTS J.M, MWANGI R.W. Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Med Vet Entomol*, 1996, 10, 71-79.
207. VULULE J.M., BEACH R.F, ATIELI F.K., ROBERTS J.M., MOUNT D.L, MWANGI R.W. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Med Vet Entomol*, 1994, 8, 71-75.
208. WAYNE DW. Biostatistics: A foundation for analysis in the Health Sciences. *John Wiley, Sons Inc*, 2005, 782pp.
209. WEILL M., DURON O., LABBE P., BERTHOMIEU A., RAYMOND M. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Med Sci*, 2003, 19, 1190-1192.
210. WEILL M., MALCOLM C., CHANDRE F., MOGENSEN K., BERTHOMIEU A., MARQUINE M., RAYMOND M. The unique mutation in *Ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*, 2004, 13, 1-7.
211. WHITE, G. B. Biological effects of intraspecific chromosomal polymorphism in malaria vector populations. *Bull World Health Organ*, 1974, 50, 299-306.
212. WIRTZ R. A, ZAVALA F., CHAROENVIT Y., CAMPBELL G.H., BURKOT T., SCHNEIDER I., ESSER K.M., BEAUDOIN R.L., ANDRE R.G. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull WHO*, 1987, 65, 39-45.
213. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Document WHO/CDS/CPC/MAL/98.12. *World Health Organization, Geneva*, 1998.
214. WHO. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. *WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3.60 pp*.
215. WHO. World Malaria Report, 2010.
216. WHO. World Malaria Report, 2011.

217. WONGSRICHANALAI C., MESHNICK S.R. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14, 716-9.
218. YADOULETON W A., PADONOU G., ASIDI A., MOIROUX N., BANGANNA S., CORBEL V., N'GUESSAN R., GBENOU D., YACOUBOU I., GAZARD K., AKOGBETO C M. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J*, 2010, 9, 83.
219. ZAIM M., AITIO A., NAKASHIMA N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol*, 2000, 14, 1–5.
220. ZAIM M., GUILLET P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol*, 2002, 18, 161-163.
221. ZHOU G., GITHEKO A.K., MINAKAWA N., YAN G. Community-wide benefits of targeted indoor residual spray for malaria control in the Western Kenya Highland. *Malar J*, 2010, 9, 67.

Annexes

Annexe 1 : Articles publiés

RESEARCH

Open Access

Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa

Martin C Akogb  to¹, Gil Germain Padonou¹, Dina Gb  nou³, Seth Irish² and Anges Yadouleton*¹

Abstract

Background: *Anopheles gambiae*, the main malaria vector in Benin has developed high level of resistance to pyrethroid insecticides, which is a serious concern to the future use of long-lasting insecticidal nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS). In this context, one of the pathways available for malaria vector control would be to investigate alternative classes of insecticides with different mode of action than that of pyrethroids. The goal of this study was to evaluate under field conditions the efficacy of a carbamate (bendiocarb) and an organophosphate (fenitrothion) against pyrethroid-resistant *An. gambiae* s.s.

Methods: Wild populations and females from laboratory colonies of five days old *An. gambiae* were bio-assayed during this study. Two pyrethroids (deltamethrin and alphacypermethrin), an organophosphate (fenitrothion), a carbamate (bendiocarb) and a mixture of an organophosphate (chlorpyriphos + a pyrethroid deltamethrin) were compared in experimental huts as IRS treatments. Insecticides were applied in the huts using a hand-operated compression sprayer. The deterrence, exophily, blood feeding rate and mortality induced by these insecticides against *An. gambiae* were compared to the untreated control huts.

Results: Deltamethrin, alphacypermethrin and bendiocarb treatment significantly reduced mosquito entry into the huts ($p < 0.05$) compared to untreated huts. Blood feeding rates in huts treated with fenitrothion and the mixture chlorpyriphos/deltamethrin were reduced from 10.95% respectively to 3.7% and 4.47% three months after treatment and from 10.20% to 4.4% and 2.04% four months after treatment. Exophily rates in huts with deltamethrin, alphacypermethrin and the mixture chlorpyriphos/deltamethrin were significantly higher than in the huts with fenitrothion. Deltamethrin and alphacypermethrin had the lowest mortality rate while fenitrothion killed 100% of *An. gambiae* (in the first month) and 77.8% (in the fourth month). Bendiocarb and the mixture chlorpyriphos/deltamethrin mortality rates ranged from 97.9 to 100% the first month and 77.7-88% the third month respectively.

Conclusion: After four months, fenitrothion, bendiocarb and the mixture chlorpyriphos/deltamethrin performed effectively against pyrethroid-resistant *Anopheles*. These results showed that bendiocarb could be recommended as an effective insecticide for use in IRS operations in Benin, particularly as the mixture chlorpyriphos/deltamethrin does not have WHOES authorization and complaints were mentioned by the sleepers about the safety and smell of fenitrothion.

Background

In Benin, malaria is one of the most frequently recorded diseases in health centres. The incidence for both uncomplicated and complicated cases in 2006 was 139 per 1,000 inhabitants [1]. During the same year, malaria was the

primary cause of mortality and morbidity in health centres in the departments of Ou  m   and Plateau [1]. Over the past few years, the National Malaria Control Programme (NMCP) has implemented control interventions to reduce the contact between malaria vectors and human hosts. The major control strategies applied at national level were the scaling up of long-lasting insecticidal nets (LLINs) throughout the country and indoor

* Correspondence: anges33@yahoo.fr

¹ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, B  nin 06 BP: 2604

Full list of author information is available at the end of the article

residual spraying (IRS) in one of the cities of Benin (Cotonou). Despite these tremendous efforts made by the NMCP, the results obtained were less encouraging than expected. Resistance was suspected to be one of the reasons of the failure of malaria vector control programmes in Benin. In 1963, the World Health Organization reported that 32 species of *Anophelinae* were resistant in Africa to DDT and dieldrin [2]. After, Elissa reported the first case of pyrethroid resistance in *An. gambiae* in Côte d'Ivoire [3]. In other regions of Africa, numerous cases were documented in Kenya [4], Burkina Faso [3,5], South Africa [6], Côte d'Ivoire [3], Mali [7] and Cameroon[8]. In Benin, the knockdown gene implicated in resistance to DDT and pyrethroids was detected at high frequency ($kdr > 0.9$), especially in the urban areas of Cotonou [9-11]. A recent study by N'guessan *et al* in an experimental hut study showed a reduced efficacy of lambdacyhalothrin-treated nets against *An. gambiae* in Ladji, an outskirt area of Cotonou [12].

Despite these reports on pyrethroid resistance in B  n  n, the National Malaria Control Programme decided to undertake, in 2008, a distribution of LLINs and to implement IRS in the department of Ou  m   particularly in the districts of S  m  -Kpodji, Dangbo, Missérété and Adjohoun. The increasing emergence of resistance leads to an urgent need to investigate alternatives to pyrethroid insecticides [13] and a continual monitoring of resistance before the implementation of any vector control programme. The widespread pyrethroid resistance is becoming a major problem faced by several National Malaria Control Programmes throughout Africa, particularly in Benin where failure of ITNs and IRS has been reported in experimental huts [12]. Experimental hut studies have shown that certain organophosphates and carbamates were particularly effective on wild populations of pyrethroid resistant vectors [14]. Field trials with the carbamates propoxur and bendiocarb for indoor residual spraying treatment have been very effective against pyrethroid resistant malaria vectors [15]. Over the past few years, there was an increasing interest in testing these insecticides for public health purposes as alternatives to pyrethroids. In the present study, we compare under semi field conditions in experimental huts the efficacy of the carbamate bendiocarb, the organophosphate fenitrothion and a mixture of chlorpyrifos(organophosphate) and deltamethrin (pyrethroid) for IRS treatment against pyrethroid resistant mosquitoes.

Methods

Study site

The study was carried out in experimental huts located in Akron at the outskirt of Porto Novo, [15], a swampy area used annually for vegetables cropping. There are many *An. gambiae* and other culicinae breeding sites around

the vegetable plots. Porto Novo is situated at 6. 33 N, 2.37 E in the southern part of Benin, about 30 kilometres from the Atlantic Ocean. The composition of *An. gambiae* s.l. is 100% *An. gambiae* s.s. M form (Padonou, unpublished) the main malaria vector in this area. This vector is present all year-round and has developed a strong resistance to pyrethroid insecticides with a high frequency of *kdr* gene at 86.7% [16].

Experimental huts

The study was conducted in experimental huts (Figure 1), which are designed for the standard WHO Phase II evaluation of insecticide-treated nets and IRS [17]. Experimental huts were originally used to study the behaviour of mosquitoes inside houses, but also used to evaluate the effect of IRS [18]. The experimental huts used were the West African type, of the Darriet model, that allows the entry of mosquitoes through the slits but not their exit. Each hut was 2.5 m long, 1.75 m wide, and had an interior ceiling 2 m high. The walls were made of concrete blocks covered with cement. The roof was made of corrugated iron. A tarpaulin was stretched under the roof to reduce heat in the hut and facilitate the capture of mosquitoes.

A 10 cm wide moat filled with water surrounded each hut to prevent the entry of scavengers such as ants and spiders. Six identical huts were built at the station. Five huts were treated with insecticides using a backpack sprayer and the sixth was left untreated as a control. The absorption of the walls was 112 ml of insecticide per m^2 and that of the ceiling (polyethylene), the entry slits, and the door (painted metal) was in total 53.13 ml/ m^2 . The area of the walls to treat was 15 m^2 and that of the roof, the doors, and the entry slits was 5.1 m^2 . To treat the walls of the huts, 1.7 L of water was used. For the rest of the huts, 270.8 ml of water was used. Using these measures, the five huts were treated according to WHO recommendations [19];



Figure 1 Experimental huts, Akron station. Courtesy CREC (September 2007).

Hut 1: Bendiocarb (800 g/kg) at 200 mg/m²;
Hut 2: Deltamethrin (250 g/kg) at 25 mg/m²;
Hut 3: Alphacypermethrin (50 g/kg at 30 mg/m²
Hut 4: Fenitrothion (400 g/kg) at 2 g/m²
Hut 5: Mixture of chlorpyriphos 250 g/L + deltamethrin 12 g/L at 560 mg/m² and 25 mg/m², respectively

Throughout the study, sleepers slept under untreated bed nets.

Biological materials

The behaviour of mosquitoes in the presence of insecticidal treatments was analysed on two samples of *An. gambiae*: The wild populations of Akron area attracted to sleepers inside experimental huts and wild *An. gambiae* emerged from field collected larvae which were released into the experimental huts. This last sample of mosquitoes was released during the period where there was insignificant density of mosquitoes entering the huts. The released *An. gambiae* were collected as larvae from the study site, and reared at the same place, so that the tested mosquitoes are not different from the wild population entering the huts. On average 20-27 not-blood-fed females of *An. gambiae* were released three times a month at 20:00 hours for a total number of 60-80 *An. gambiae* per hut.

Sleepers and mosquito collection

Before the beginning of the evaluation, a blank collection of mosquitoes was carried out during two weeks in the experimental huts to compare the natural attractiveness between huts. Sleepers spent the same number of nights in each hut. The collections were done by six volunteer adult men, recruited by the CREC from the study area. The collectors were rotated between the huts, sleeping under a mosquito net from 21:00 hours to 06:00 hours. At 06:00 hours, mosquitoes were collected in the hut, using a mouth aspirator in the veranda and the hut room. By 08:00 in the morning, collection in huts was completed. All mosquitoes were put in netted plastic cups and transferred to the laboratory for identification. Mosquitoes were identified into species using Coluzzi key [20] and recorded as dead or alive, fed or unfed. Live mosquitoes were held in plastic cups and delayed mortality was recorded after 24 h. The effects of each treatment were expressed relative to the control in terms of:

- Deterrence rate: percentage of reduction in the number of mosquitoes caught in treated hut relative to the number caught in the control hut;

- Exophily rate: percentage of mosquitoes that have escaped the hut and have taken refuge in the veranda trap divided by the total number of mosquitoes collected in the hut;

- Blood-feeding rate: percentage of blood fed mosquitoes collected divided by the total of mosquitoes collected in verandah and hut;

- Immediate mortality: percentage of dead mosquitoes collected in the morning compared to total mosquitoes collected in the hut;

- Overall mortality: general mortality: immediate mortality + delayed mortality recorded after 24 h.

Collection of qualitative data

Over the course of the study, interviews were conducted to identify any side effects of insecticide treatments on the collectors. These interviews were conducted at the end of the first and fourth month of collection.

Statistical analysis

The statistical analysis was conducted using SPSS (Version 16.0). The effect of treatments was evaluated using analysis of variance (ANOVA) to compare treatments to the control.

Ethical approval

The present study received a formal approval from the Ministry of Health of Benin and the Entomological Research Centre of Cotonou (CREC). The consent of all volunteers was required before their participation in the study. Malaria prevention and curative treatments were provided to all sleepers in the huts who showed symptoms of the disease.

Results

Attractiveness of huts before treatment

The homogeneity of attractiveness of the experimental huts was verified using ANOVA on the numbers of mosquitoes caught in each hut prior to treatment. This analysis showed (Figure 2) that the individual huts did not differ significantly in terms of the number of mosquitoes entering ($p = 0.228$ for *An. gambiae* and $p = 0.257$ for culicine mosquitoes).

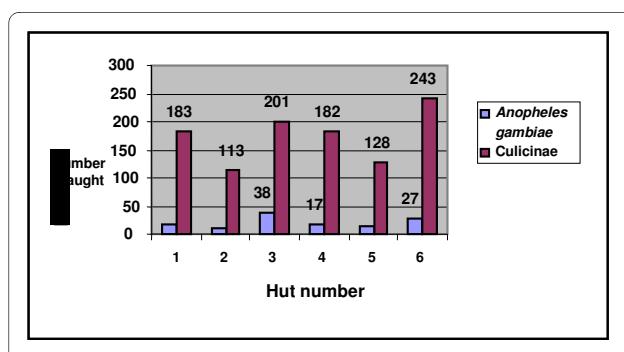


Figure 2 Number of *An. gambiae* and culicinae mosquitoes collected in the experimental huts (September 5-17, 2007) before insecticidal treatment (Sleepers spent the same number of nights in each hut).

Table 1: Data of wild *Anopheles gambiae* collected 2 months post-treatment IRS (September to November 2007)

Treatments	Month	Number of females caught	Deterrency (%)	Exophily (%)		Blood feeding (%)		Immediate mortality (%)		Overall mortality (%)	
				Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim
Control	1	80	-	12,5^a		- 31,25^a		- 0^a		- 3,7^a	-
	2	101	-	19,80 ^a		- 29,70 ^a		- 0 ^a		- 2,97 ^a	
Bend	1	70	12,5	28,6^a	[14,49-42,30]	20^a	[12,13-31,85]	57,14^c	[48,65-69,86]	92,85^c	[85,76-99,65]
	2	80	20,79	22,50 ^a	[9,80-28,85]	12,50 ^b	[3,05-19,05]	25 ^{bc}	[10,93-41,82]	68,75 ^c	[56,42-81,80]
Delta	1	55	31,25	45,4^b	[25,31-74,95]	18,18^a	[6,28-33,91]	32,72^b	[18,40-51,46]	72,72^b	[58,79-84,06]
	2	76	24,75	26,31 ^a	[15,86-37,36]	23,68 ^a	[7,04-50,63]	15,78 ^b	[6,81-29,32]	31,57 ^b	[22,81-40,33]
A-Cyper	1	61	23,8	42,6^b	[24,62-61,36]	19,67^a	[6,65-33,45]	27,86^b	[16,29-44,95]	77,04^b	[59,85-95,52]
	2	89	11,88	22,47 ^a	[15,18-31,77]	13,48 ^a	[6,88-21,50]	19,10 ^b	[10,98-29,85]	39,32 ^b	[34,33-44,32]
Féni	1	85	0	24,7^a	[13,16-39,70]	9,41^b	[3,03-17,35]	91,76^d	[84,30-96,87]	100^c	[100-100]
	2	95	5,94	22,10 ^a	[14,20-28,93]	12,63 ^b	[4,14-20,38]	40 ^{cd}	[30,73-52,55]	73,68 ^c	[64,41-82,95]
Chlor-Delta	1	85	0	17,6^a	[8,95-25,94]	10,58^b	[3,01-22,59]	95,3^d	[89,20-101,36]	100^c	[100-100]
	2	70	30,69	25,71 ^a	[15,05-39,97]	11,42 ^b	[4,02-17,35]	44,28 ^d	[27,12-74,50]	78,57 ^c	[62,06-95,00]

Bend: Bendiocarb; Delta: Deltamethrin; α-Cyper: Alpha-cypermethrin; Feni: Fenitrothion; Chlor- Delta: Chlorpyriphos + Deltamethrin.

Conf Lim: 95% confiance limits

For a same parameter of the table, values which carry different letters in exposant were significantly differents ($p < 0.05$).

Results of collections after insecticide treatment

Deterrency and induced exophily

During the course of the first month after treatment, the huts treated with deltamethrin and alphacypermethrin had a significant deterrency for *An. gambiae* of 31.3% and 23.8%, respectively compared to the control hut (Table 1), and for culicinae of 46.2% and 38.4% (Table 2). The deterrency of the huts treated with bendiocarb, fenitrothion, and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture were not significantly different from the control hut ($p > 0.05$). However, during the second month, the huts with deltamethrin and the mixture of chlorpyriphos and deltamethrin had shown a deterrency for *An. gambiae* of 24.8% and 30.7%, respectively (Table 2).

In addition to reduction of entry, the huts treated with deltamethrin and alphacypermethrin induced significant levels of exophily ($p < 0.05$) on wild *An. gambiae* (Table 1), as well as those released in the huts (Table 3). This was not the case with other treatments, which were not significantly different from the control ($p > 0.05$). However, a significant increase in exophily was noted with bendiocarb, fenitrothion and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture ($p < 0.05$). In the third and fourth months, the exophily in huts treated with alphacypermethrin and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture increased from 42.3 to 55.9% and from 35.8 to 57.1%, respectively.

Blood feeding

The blood feeding rates of wild Anopheles entering the huts treated with deltamethrin, alphacypermethrin, and bendiocarb were not significantly different from the control hut during the first month ($p > 0.05$) (Table 1). Contrary to what was observed with wild Anopheles, with the culicine and the released *An. gambiae*, the blood feeding rates in all five insecticide treatments were significantly less than that of the control ($p < 0.05$). In the second

month, the blood feeding rates of mosquitoes in the Bendiocarb, fenitrothion and chlorpyriphos-deltamethrin mixture huts were significantly less than the control hut ($p < 0.05$). Over the third and fourth months, blood feeding in the chlorpyriphos-deltamethrin mixture and fenitrothion huts remained lower than that of the control ($p < 0.05$).

Immediate mortality

During the first two months, the immediate mortality rates of mosquitoes in huts treated with deltamethrin and alphacypermethrin were significantly higher than the control ($p < 0.05$). During the second month (Table 3), the mortality of released *An. gambiae* in hut treated with alphacypermethrin (39.0%) was significantly higher than that treated with deltamethrin ($p < 0.05$). For bendiocarb, the immediate mortality during the first month was clearly higher than that of deltamethrin and alphacypermethrin, but less than that of fenitrothion and the mixture of chlorpyriphos and deltamethrin. During the second month, the immediate mortality in the chlorpyriphos-deltamethrin hut (44.3% for wild *An. gambiae*, Table 1) remained unchanged. The released *An. gambiae*, in fenitrothion and the mixture chlorpyriphos-deltamethrin huts resulted in highest rates of immediate mortality, giving 74.4% and 70.6%, respectively. During the third and fourth months, there was a complete decline of the immediate mortality in huts with deltamethrin (6.4%) and alphacypermethrin (3.1%). However, the insecticidal effects of fenitrothion 68.6% and 71.1%, chlorpyriphos-deltamethrin 61.2% and 28.6%, alphacypermethrin 3.4% and 29.4%, and bendiocarb 69.5% and 10.9% remain continually high (Table 3).

Overall mortality

Over the first month, deltamethrin and alphacypermethrin showed good performance with high overall

Table 2: Data of wild *Culex* sp. and *Mansonia* sp. one month after IRS treatment (September to October 2007).

Treatments	Number of females Catches	Deterrency (%)		Exophily (%)		Blood feeding (%)		Immediate mortality (%)		Overall mortality (%)	
		Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim
Control	975	-	30,76 ^a	-	19,48 ^a	-	0,30 ^a	-	2,56 ^a	-	-
Bend	550	43,58	27,27 ^a [23,00-32,53]	16,36 ^b [14,22-19,00]	19,09 ^c [15,84-23,02]	38,36 ^c [35,46-41,35]					
Delta	525	46,15	33,33 ^a [28,67-38,33]	14,28 ^b [9,58-20,07]	8,5 ^b [7,07-10,10]	20,95 ^b [17,74-23,79]					
α-Cyper	601	38,35	33,44 ^a [31,74-35,72]	16,63 ^b [9,24-24,02]	11,81 ^b [5,57-18,05]	24,29 ^b [14,57-33,72]					
F��ni	805	17,43	21,73 ^a [18,41-24,63]	14,90 ^b [13,91-15,77]	31,18 ^e [27,80-34,13]	53,41 ^d [50,14-56,37]					
Chlor- Delta	850	12,82	27,05 ^a [25,10-29,01]	14,11 ^b [12,79-15,45]	23,64 ^d [22,26-24,86]	52,11 ^d [49,22-55,21]					

Bend: Bendiocarb; Delta: Deltaméthrin; α -Cyper: Alpha-cyperm  thrin; F  ni: Fenitrothion; Chlor- Delta: Chlorpyriphos + Deltaméthrin.

Conf lim: 95% confiance limits

For a same parameter of the table, values which carry different letters in exposant were significantly differents ($p < 0,05$).

Table 3: Data of *Anopheles gambiae* collected during 4 months after IRS treatment (September 2007 to January 2008)

Treatments	Month	Number of females caught	Exophily (%)		Blood feeding (%)		Immediate mortality (%)		Overall mortality (%)	
			Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim
Control	1	62	16,12 ^a	-	32,25 ^a	-	0 ^a	-	3,22 ^a	-
	2	73	27,39 ^a	-	13,69 ^a	-	0 ^a	-	2,73 ^a	-
	3	73	6,84 ^a	-	10,95 ^a	-	0 ^a	-	4,10 ^a	-
	4	49	42,85 ^a	-	10,20 ^a	-	0 ^a	-	6,12 ^a	-
Bend	1	60	25 ^b	[21,92-28,16]	25 ^b	[21,92-28,16]	50 ^e	[43,86-56,31]	81,66 ^d	[76,23-87,20]
	2	48	33,33 ^b	[28,28-38,31]	10,41 ^a	[2,43-18,19]	72,91 ^d	[67,44-78,50]	81,25 ^d	[68,78-94,14]
	3	72	51,38 ^e	[45,40-57,37]	8,33 ^a	[8,33-8,33]	69,44 ^c	[63,47-75,40]	77,77 ^c	[71,79-83,76]
	4	46	63,04 ^d	[54,68-71,42]	4,34 ^a	[-5,11-14,01]	10,86 ^b	[1,82-19,85]	47,82 ^d	[35,72-60,11]
Delta	1	60	38,33 ^c	[29,55-47,26]	16,66 ^d	[7,31-19,24]	25 ^b	[21,92-28,16]	66,66 ^b	[62,45-70,95]
	2	52	71,15 ^d	[68,80-73,47]	9,61 ^a	[1,57-17,60]	7,69 ^b	[-0,9385-16,4]	67,30 ^c	[59,88-74,76]
	3	63	23,80 ^b	[23,81-23,81]	6,34 ^a	[-0,48-13,17]	6,34 ^a	[-0,48-13,17]	22,22 ^b	[15,39-29,05]
	4	32	46,87 ^{ab}	[40,44-53,49]	9,37 ^a	[8,09-10,70]	3,12 ^a	[-10,00-16,07]	28,12 ^b	[24,26-32,09]
α-Cyper	1	60	35 ^c	[30,70-39,42]	18,33 ^c	[10,71-26,02]	26,66 ^b	[22,15-31,11]	78,33 ^c	[71,68-81,75]
	2	82	59,75 ^c	[57,66-61,82]	12,19 ^a	[7,60-16,73]	39,02 ^c	[34,39-43,65]	60,97 ^b	[56,34-65,60]
	3	78	42,30 ^d	[42,31-42,31]	5,12 ^a	[-0,37-10,63]	3,84 ^a	[3,85-3,85]	24,35 ^b	[18,85-29,86]
	4	34	55,88 ^{bcd}	[38,81-73,31]	5,88 ^a	[-6,97-19,10]	29,41 ^c	[14,60-44,47]	35,29 ^c	[31,01-39,70]
Féni	1	70	27,14 ^b	[22,70-31,53]	24,28 ^b	[18,65-29,90]	42,85 ^c	[40,28-45,47]	85,71 ^d	[80,54-90,96]
	2	43	67,44 ^d	[58,43-76,49]	11,62 ^a	[1,95-21,23]	74,4 ^d	[65,25-83,63]	83,72 ^d	[75,62-91,99]
	3	54	22,22 ^b	[19,18-25,34]	3,7 ^b	[-4,31-11,73]	68,51 ^c	[56,65-80,65]	90,74 ^d	[76,47-105,37]
	4	45	51,11 ^{bc}	[41,55-60,66]	4,44 ^a	[-5,11-14,01]	71,11 ^d	[61,55-80,66]	77,77 ^f	[65,99-85,11]
Chlor- Delta	1	80	25 ^b	[20,89-29,07]	26,25 ^b	[24,84-27,68]	46,25 ^d	41,64-50,86	81,25 ^d	[72,79-89,80]
	2	68	58,82 ^c	[53,40-64,26]	8,82 ^a	[8,28-9,40]	70,58 ^d	[66,09-75,15]	82,35 ^d	[76,92-90,67]
	3	67	35,82 ^c	[33,56-38,09]	4,47 ^b	[4,19-4,77]	61,19 ^b	[55,50-66,89]	88,05 ^d	[81,93-94,21]
	4	49	57,14 ^{cd}	[45,17-60,66]	2,04 ^b	[-6,88-11,05]	28,57 ^c	[20,57-36,53]	63,26 ^e	[60,07-66,41]

Bend: Bendiocarb; Delta: Deltaméthrin; α-Cyper: Alpha-cyperméthrin; Féni: Fénitrothion; Chlor- Delta: Chlorpyriphos + Deltaméthrin.
Conf Lim: 95% confiance limits

For a same parameter of the table, values which carry different letters in exposant were significantly different ($p < 0,05$).

mortality of 72.1% and 77.0 on wild *An. gambiae* (Table 1). Fenitrothion and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture had the highest mortality rates with 81.3% and 85.7%, respectively on wild *An. gambiae* (Table 3) and 52.1% and 53.4% on culicine (Table 2). A higher overall mortality rate was found in the hut treated with bendiocarb (92.8%), the chlorpyriphos-deltamethrin (100%), and fenitrothion (100%) on wild *An. gambiae*. During the second month, the effect of deltamethrin and alphacypermethrin was reduced to 31.6% and 39.3%, respectively. However, the residual effects of carbamates and organophosphates remained high until the third month with mortality rates of 77.8% for bendiocarb, 90.7% for fenitrothion and 88.1% for the mixture chlorpyriphos-deltamethrin. Over the fourth month, the overall mortality with deltamethrin treatment declined to 28.1% while fenitrothion had the highest rate at 77.7%, followed by the chlorpyriphos-deltamethrin mixture, bendiocarb, and alphacypermethrin.

Side effects of the treatment on sleepers

A regular follow up of side effects of the insecticide treatments on sleepers was conducted using a questionnaire. Certain complaints were registered during the first months when the sleepers spent the night in the huts treated with fenitrothion and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture. The effects noted were irritating action to the eyes and nose.

But no negative effects were noted during the fourth month. However, the sleepers noticed that the treatments were reducing the biting nuisance of mosquitoes in the treated huts than in their own homes or the control hut. In response to the question "Would you like to continue the experiment?" all responded "yes."

Discussion

The initial collections before the insecticide treatments in the huts revealed that the huts were not significantly different in their attractiveness. However, huts 2 and 5 collected the fewest mosquitoes. Hut 6 caught the most culicinae and hut 3 caught the most *An. gambiae*. These effects were probably due to the proximity of the huts to the larval sites.

The deterrence or reduction of entry rates for both *An. gambiae* and culicinae was the most evident factor observed in huts treated with the pyrethroids, alphacypermethrin and deltamethrin. As for fenitrothion and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture, the reduction was very low and this may probably due to the fact that organophosphates have not repellent action compared with pyrethroids (deltamethrin and alphacypermethrin) [21]. However, the entry rate in the hut treated with bendiocarb was reduced compared to that of organophosphates. Natural exophily (in the control hut) of *An. gambiae* varied throughout the study. The lowest

rate (6.8%) was observed in 3rd month after treatment and the highest rate the following month (42.8%). It is very difficult to explain this variation in behaviour as both rates take place during the same period. These months correspond to the beginning of the dry season and do not seem to result from changes of behaviour in humans or mosquitoes.

The induced exophily (in the treated hut) of wild *An. gambiae* was the highest in huts where walls were treated with alphacypermethrin and deltamethrin as a result of the repellent effect pyrethroids, which was not observed with carbamates and organophosphates. In contrast, the induced exophily on released *An. gambiae* in huts treated with fenitrothion and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture was relatively high. The strong exophily due to the carbamates and organophosphates on these specimens might be explained by the fact that the *An. gambiae* released in the huts had lost their vigour after being reared in the insectary. The effect of the chlorpyriphos-deltamethrin mixture could be explained by a synergy between the two products. Similar results were found when testing combinations of non-pyrethroid insecticides and a repellent (DEET), an organophosphate (chlorpyriphos methyl) and an oxadiazine (Indoxacarb) alone or in combination with pyrethroids on resistant mosquitoes [22-25].

The treatment of the huts with insecticide did not prevent a proportion of mosquitoes from taking a blood meal. This blood meal was facilitated by the fact that the mosquito nets used to protect sleepers were not treated. The fact that deltamethrin, alphacypermethrin, and bendiocarb did not significantly reduce blood feeding compared to the control might be explained by the significant immediate mortality in the other two insecticides during the first month, fenitrothion (91.7%) and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture (95.3%) ($p < 0.05$). In these cases, mosquitoes entering the huts could also have been killed before being able to blood feed.

The mortality of culicinae was only 53.4% with fenitrothion in the first month; this can be explained by the resistance of culicinae, largely *Culex* and *Mansonia* spp. Resistance to organophosphates, carbamates, and pyrethroids has been reported in *Culex quinquefasciatus* in West Africa [9]. Moreover, in Ladji (south of B  n  ) high frequencies of resistance to permethrin, DDT and carbosulfan were recorded in *Cx. quinquefasciatus* [26]. However, the *An. gambiae* were strongly affected by fenitrothion, the mixture of chlorpyriphos-deltamethrin, and bendiocarb. The difference between carbamates, organophosphates and pyrethroid insecticides can be explained by the current emergence and widespread resistance of *An. gambiae* s.l. to pyrethroids that we mentioned earlier [10]. Other than the complaints about fenitrothion and the chlorpyriphos-deltamethrin mixture

that caused certain minor problems in the beginning of the first month, there was no other complaints recorded about the pyrethroids or bendiocarb afterwards. These experiences were noted and confirmed by the sleepers. It should be noted that chlorpyriphos is not recommended by the WHO for indoor residual spraying [20].

Conclusion

After four months experiment of indoor residual spraying treatments in experimental huts, fenitrothion, chlorpyriphos-deltamethrin mixture, and bendiocarb were shown to be effective insecticides for controlling pyrethroid-resistant *Anopheles*. They showed to be effective alternatives to pyrethroids for indoor residual spraying. Bendiocarb decayed in less than four months, showing a short-life on cement walls, but still seems a promising insecticide to control resistant vectors. A micro-encapsulation formulation of bendiocarb will make it last longer in treated supports. Reports from Equatorial Guinea, Namibia, Mozambique, Mexico, and India showed good performance of bendiocarb as an indoor residual spraying treatment against mosquito vectors. The mixture of chlorpyriphos and deltamethrin is not yet registered with the WHO and cannot be imported for public health purposes. Fenitrothion was an effective product, but the side effects were not appreciated by the sleepers, however reports on fenitrothion indicated its better personal protection effects than Bendiocarb.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MCA conceived and designed the study, supervised fields and laboratory procedures, data analysis and interpretation, revised the manuscript and gave final approval for the version to be published. **GGP** carried out field experiments, collected, analysed, interpreted data and wrote the first draft of the manuscript. **SI** helped with translation of the manuscript and contributed to the design of the study. **DG** and **AY** contributed to the design of the study and substantially helped in drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative) which supported financially this study through USAID and RTI. The authors would like to thank especially Dr Alex Asidi of London School of Hygiene & Tropical Medicine in Cotonou (CREC) for his helpful suggestions and correction made to the manuscript. Many thanks to Dj  nontin Armel and Azondékon Roseric for their technical assistance.

Author Details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, B  nin 06 BP: 2604, ²London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, WC1E 7HT, UK and ³World Health Organization Office, Cotonou, B  nin

Received: 11 December 2009 Accepted: 14 July 2010

Published: 14 July 2010

References

1. de la Santé Ministère: *Annuaire des statistiques sanitaires 2006*. Direction de la Programmation et de la Prospective Cotonou 2007:209.
2. Darriet F: *La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies*. Editions Karthala 1998:111.
3. Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY, Yao K: *Resistance of Anopheles gambiae s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire*. Ann Soc Belge Méd Trop 1993, **73**:291-294.
4. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Roberts JM, Mount DL, Mwangi RW: *Reduced susceptibility of Anopheles gambiae to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya*. Med Vet Entomol 1994, **8**:71-75.
5. Diabaté A: *Evaluation de la résistance des vecteurs du paludisme vis-  s-vis des pyréthrinoides au Burkina Faso*. Thèse de 3e cycle Université de Ouagadougou 1999:128.
6. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: *Anopheles funestus resistant to pyrethroid insecticides in South Africa*. Med Vet Entomol 2000, **14**:181-189.
7. Fanello C, Petrarca V, Della Torre A, Santolamazza F, Allouche A, Coulibaly M, Dolo G, Curtis C, Tour   YT, Coluzzi M: *The pyrethroid knock-down resistance gene in the Anopheles gambiae complex in Mali and further evidence of reproductive isolation within An.gambiae s.s.* Insect Mol Biol 2003, **12**:241-245.
8. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: *Insecticide susceptibility status of Anopheles gambiae s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon*. J Med Entomol 2003, **40**:491-497.
9. Chandre F: *Résistance d'Anopheles gambiae Giles et de Culex pipiens quinquefasciatus Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles*. Thèse de Doctorat. Université de Paris XII: 1998:112.
10. Akogbéto M, et Yakoubou S: *Résistance des vecteurs du paludisme vis-  s-vis des pyréthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest*. Bull Soc Pathol Exot 1999, **2**:123-130.
11. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbéto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P: *Status of pyrethroid résistance in Anopheles gambiae s.l.* Bull World Health Organ 1999, **77**:230-234.
12. N'guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M: *Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin*. Emerg Infect Dis 2007, **13**:199-206.
13. Zaim M, Guillet P: *Alternative insecticides: an urgent need*. Trends Parasitol 2002, **18**:161-163.
14. Kolaczinski JH, Fanello C, Hervé JP, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CP: *Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance*. Bull Entomol Res 2000, **90**:125-132.
15. Carnevale P, Mouchet J: *Vector control and malaria control*. Med Trop 1990, **50**:391-398.
16. Yadouleton AWM, Asidi A, Djouaka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbéto CM: *Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of Anopheles gambiae in urban areas of Benin*. Malar J 2009, **8**:103.
17. World Health Organization: *Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets*. WHO/CDS/NTD/WHOPE/GCDPP/2006.3
18. Wharton RH: *The behaviour and mortality of Anopheles maculatus and Culex fatigans in experimental huts treated with DDT and BHC*. Bull Entomol Res 1951, **42**:1-20.
19. Najera JA, Zaim M: *Lutte contre les vecteurs du paludisme. Critères et procédure de prise de décision pour une utilisation raisonnée des insecticides*. OMS Genève; 2004.
20. Coluzzi M: *Morphological divergences in the Anopheles gambiae complex*. Riv Malaria 1964, **43**:197-232.
21. Darriet F: *Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyréthrinoides dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme*. Parassitologia 1991, **33**:111-119.
22. N'guessan R, Corbel V, Bonnet J, Yates A, Asidi A, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Rowland M: *Evaluation of Indoxacarb, an Oxadiazine insecticide for the control of Pyrethroid-Resistant Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae)*. J Med Entomol 2007, **44**:270-276.
23. Pennetier C: *Interactions entre insecticides non pyréthrinoides et répulsifs pour la lutte contre Anopheles gambiae : mécanismes*,

- efficacité et impact sur la sélection de la résistance. Thèse Doctorat de l'Université de Montpellier; 2008.
24. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM: Combining a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling Kdr resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:739-744.
 25. Asidi AN, N'guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW: Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyriphos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 2005, **4**:25.
 26. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard JM, Rowland M: Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.

doi: 10.1186/1475-2875-9-204

Cite this article as: Akogbéto et al., Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa *Malaria Journal* 2010, **9**:204

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Full Length Research Paper

Studying physical and sociological environment of malaria to implement an indoor insecticide spraying campaign in Oueme region, Benin

G. G. Padonou^{1,2*}, G. L. Gbédjissi², H. S. Bankolé³, H. Noukpo¹, A. Yadouléton¹, M. C. Akogbéto^{1,2}

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Bénin.

²Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Bénin.

³Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi (EPAC), Université d'Abomey Calavi, Bénin.

Accepted 10 November, 2011

Malaria is among the main problems of public health in Africa. In Benin, indoor residual spraying (IRS) of bendiocarb has been proposed by the National Malaria Control Programme in the districts of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme to help eradicate the malaria-causing mosquito. Prior to implementing an IRS program, a study of the local physical and sociological environment was assessed to identify the existing limits of this strategy. Cross-sectional study was conducted in April 2008. A total of 3,228 persons (adult male and female heads of household) were included in the study through systematic random sampling procedure for household survey. Both qualitative and quantitative methods were applied for data collection. The findings showed that the mosquito bite was the most feared (54.4%) for all districts. The most popular practices used for malaria treatment were traditional (56.3%) and modern (43.7%) medicine. IRS was accepted by 98.7% of respondents. Most of the walls (71.5%) were smooth and lend themselves well to the insecticide treatment. Habitats made of bamboo and straw were not appropriate for IRS due to pollution and poisoning risks. Free distribution of insecticide treated nets was the strategy recommended for households of these types of habitat.

Key words: Malaria-causing mosquito, questionnaire-based interview, indoor residual spraying (IRS), insecticide-treated net, Benin.

INTRODUCTION

Malaria is an environmental problem inducing negative impacts on both the health and economy in tropical countries. Global resource requirements for malaria control were estimated to exceed US\$ 5 billion a year between 2010 and 2015 (WHO, 2010). Despite considerable worldwide efforts made in recent years to control malaria (Feachem and Philipps, 2009), the disease is still a major public health problem with nearly 250 million cases and about one million deaths each year. In 2007, malaria was declared to be the most important disease in Benin, leading to 43% of all medical consultations and 29% of

hospital admissions (MS, 2007b). Unfortunately, *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs (Le Bras, 1999) and resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids (Elissa et al., 1993; Chandre et al., 1999; Akogbeto and Yakoubou, 1999; Corbel et al., 2007; Yadouleton et al., 2010) used to treat mosquito nets, undermine efforts to cure the disease all over the world. In April 2000, because of this serious situation, the Heads of States and Governments of the African Union emphasized the need to increase efforts for controlling malaria. In April 2008, the United Nations put forward a vision of halting malaria deaths by ensuring universal coverage of malaria strategies by the end of 2010. The goal was for malaria vector control tools to be made available to all people at risk of malaria, especially women and children in Africa, and for all public health

*Corresponding author. E-mail: pagergil@yahoo.fr. Tel: (229) 21330825. Fax: (229) 21308860.

facilities to be able to provide effective malaria diagnosis and treatment (WHO, 2010). In such a context, the Ministry of Health of Benin and the National Malaria Control Program (NMCP) decided to establish a program to achieve this aim during the period 2011 to 2015 as part of its national malaria control strategic plan. The choice, by the related authorities in Benin, of indoor residual spraying (IRS) as a malaria control method, was based on the need to reinforce the action of the long-lasting insecticidal treated nets (LLITNs). Before extending the strategy to the national level, four districts in Oueme region namely Seme-Kpodji, Dangbo, Misserete and Adjohoun, were selected for a first trial. Malaria was stable in Oueme region. People were more vulnerable to malaria infection as compared to the people of other areas (MS, 2007b) due to fact that Oueme region was wet, covered with forests and crossed by perennial rivers and streams. In Africa, the major reasons for the persistence of malaria may be associated with the socio-economic situation (Farid, 1980). Social issues including people's perceptions and their coping strategies were not taken into account while planning and implementing the malaria eradication/control program. Previous studies (Ongore et al., 1989; Greenberg et al., 1989; Yeneneh et al., 1993; Aikins et al., 1994; Shey et al., 2011) show that the general public's knowledge on the cause of malaria and other determinants in Africa are poor. Analyses, using the outcomes from knowledge, attitudes and practices (KAP) studies of communities, have become important in malaria control interventions (Kyawt-Kyawt and Alan, 2004). Malaria vector control programs must be tailored to fit the local needs of the community, based on the information collected from such analyses (Ongore et al., 1989; Hla-Shein et al., 1998). The results of these types of studies could be incorporated into the decision making processes, the design of interventions with active community participation, and the implementation of vector control activities (Nieto et al., 1999). No knowledge and practices relating to malaria data from Oueme were available. Recent data are few and go back up to the year 1996 (Akogbeto and Feliho, 1996) and 2000 (Kiniffo et al., 2000). Thus, in order to collect baseline data related to the practices against mosquitoes, malaria knowledge of the people and types of human dwellings, surveys were performed during April 2008 in the study area before implementing indoor insecticide spraying. This paper reports these baseline data.

METHODS

Study areas

The study sites are located in Benin (West Africa) and include the four districts Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme- Kpodji, part of the Oueme region (Figure 1). The total population of those districts is 310,400 inhabitants (INSAE, 2004). All four districts cover an area of 977 km² and have 64,799 households with 62,890 children aged 0 to 5 years, spread in 174 villages (INSAE, 2004). The cumulative incidence of malaria (number of new cases of

malaria in the year 2006 divided by the size of the population initially at risk) is 143.8 cases per 1,000 persons in Oueme region which ranks second in the country after Littoral region (146.6 cases per 1,000 persons) (MS, 2007b). The rate of use of health services in Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme was 32, 41, 20 and 40% respectively (MS, 2007a). The four districts are characterized by a sub-equatorial climate, with two dry seasons (August-September and December-March), and two rainy seasons (April-July and October-November). The monthly average temperatures extend from 26 to 31°C. Each district just like Oueme region, was characterized by two types of environments:

1. The first is a highland zone situated far from flooding areas. Mosquito breeding sites are created particularly during the rainy seasons.
2. The second environment is represented by a swampy zone named peripheral area and is made up of marshy land converted to vegetable gardens. Land management in this vegetable growing area creates perfect breeding site for *An. gambiae*.

Sampling

According to the characteristics ecological and sociological data relating to the prevention and management of malaria, ten representative villages were selected in each district. The sample size was determined using the formula proposed by Wayne (2005):

$$N = \frac{t^2 \times p(1-p)}{M}$$

N=required sample size; t=confidence level of 95% (typical value, 1.9); p=estimated prevalence of malaria in the area; M= error margin of 5% (typical value 0.05%).

Considering the absence of any reliable statistical data on the prevalence of malaria, this parameter was estimated at 50% (Wayne, 2005; Seck et al., 2008; Albouy-llaty, 2009) for each district. Hence, the sample size calculated was N = 384. Five percent were added to this value to reflect contingencies such as non-response or recording errors. This size was then multiplied by 2 to reduce the cluster effect (Seck et al., 2008) and the obtained value was 807 individuals per district.

Surveys

It is a cross-sectional study, descriptive and analytically based on cluster sampling, conducted in April 2008 during a period of three weeks. The survey consisted of 3,228 individuals including adult male and female heads of household (family unit). The respondents' consent was sought and gained by explaining the aims of the study. The questionnaire was administered to them by trained interviewers. The questionnaire contained items on educational level of the heads of household, their perceptions related to mosquito discomfort (bite, malaria) common practices used for malaria prevention (ITN, IRS) and treatment (traditional medicine and modern antimalarial drugs) and the type of habitat (roof, ceiling, wall nature, wall surface). Subjects who could not read or write or understand French language were communicated to in "Ouémè" – the local language of the Oueme region. The statistical unit was the head of household. During each interview of head household, observations were focused on both conditions and status of his habitat type: space between wall and roof, crack in wall, hole in ceiling, wall nature (cement, banco) as well as wall surface (smooth, rough). Only sleeping quarters were considered during the investigation. Apart from individual information collected through the questionnaire, a focus group (Krueger, 1994) involving

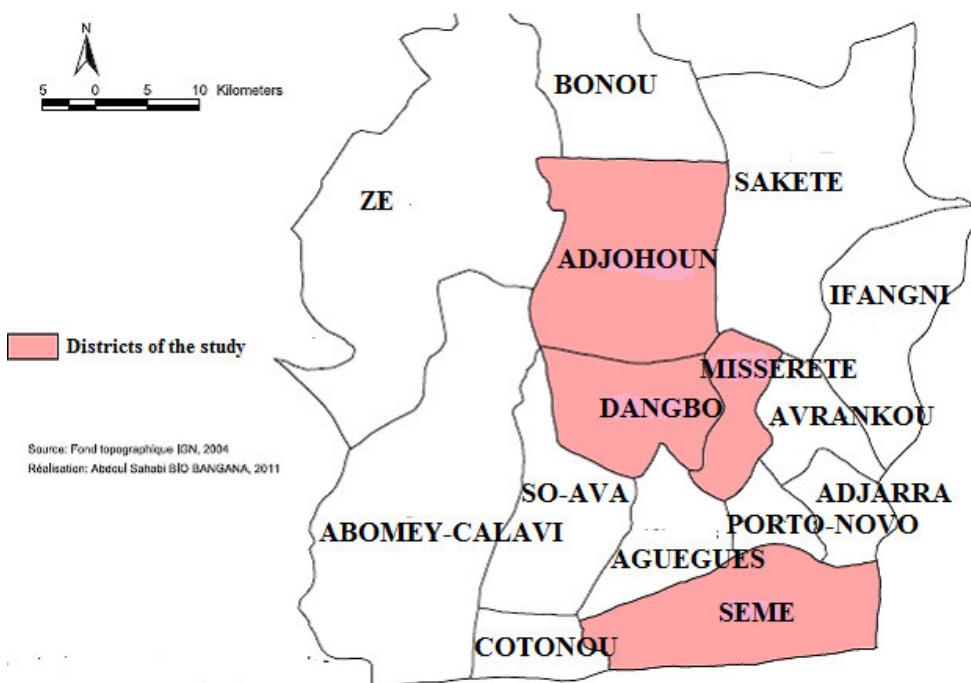


Figure 1. Map of study area.

opinion leader (size of 10) was conducted in each village to better understand the attitudes of the people, their comprehension and their perceptions of LLINs and the IRS.

Statistical analysis

Responses and information obtained from the survey were entered in computer using Microsoft Office Excel 2007 for windows. Then, simple descriptive statistics such as frequency and percentage of variables were computed and cross-tables were produced using SPSS (Version 16.0) software.

A chi-square test for the comparison of proportions was performed to compare the proportions of each variable related to each region. For binary outcome variables, a multivariate logistic regression mixed model was used to test association between knowledge of the IRS with the 3 covariates (sex, education level, and medical practices) on the one hand, and association between acceptances of IRS, with the previous 3 covariates on the other hand. The level of significance was 0.05.

RESULTS

Knowledge, attitudes and practices of the population related to malaria and its vector

Females constituted 75.9% ($n=2450$) of the 3,228 heads of households that were interviewed. 42.5% respondents were illiterate (Table 1). The highest illiteracy rate was observed among women and was 60.1 against 49.2% for men. The mosquito bite is the most feared (54.4%) for all districts. The knowledge on the cause of malaria was relatively poor in four districts and was 21.8, 34.2, 26.3, and 35.8% in Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme,

respectively (Table 1). 953 (29.5%) participants in all districts stated that malaria is caused by a mosquito bite compared to 2275 (70.5%) who did not know the correct cause of malaria. However during group discussions, some people reported: "I suffer mosquito bites. When a mosquito bites me, I spend endless minutes scratching the part where I was bitten."

Like home remedy, practice of self-treatment for malaria was popular in south of Benin. In all the districts, the practice of traditional medicine (56.3%) for malaria cases was significantly higher than the practice of modern medicine (43.7%) (Table 1). During the focus group discussion, the participants argued that: "It was unwise to attempt self-medication by using traditional medicine or modern drugs in case of malaria fever. Because we are poor and have no means to visit the hospital for treatment appropriated. In addition, hospitals are rare and very far from us. But after several days of symptoms recognition when self-treatment failed to cure illness, we visit the hospital for treatment."

Mosquito nets and others measures used by people to fight against mosquitoes

In the study area 1,042 persons (32.3%) slept under mosquito impregnated nets and 695 (21.5%) under ordinary nets (Table 2). Mosquito nets (53.8%) and spiral (27.6%) were the main means of prevention used against mosquito bites. Some people have a feeling of heat (12.3%) when sleeping under a mosquito net (Table 2); for others, it was the feeling of suffocation (0.7%). Some

Table 1. Rates (%) of education level, individuals perceptions and practices of the population related to malaria and its vector, according to localities.

Variable		Adjohoun		Dangbo		Misserete		Seme		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Educational level	Can read and write	381	47.2 ^a	306	37.9 ^a	344	42.6 ^a	342	42.3 ^a	1373	42.5 ^a
	Cannot read and write	426	52.7 ^a	501	62 ^b	463	57.3 ^b	465	57.6 ^b	1855	57.4 ^b
Perceptions about mosquito discomfort	Any	3	0.4 ^a	0	0.0 ^a	3	0.4 ^a	9	1.1 ^a	15	0.5 ^a
	Bite	479	59.4 ^e	415	51.4 ^e	491	60.8 ^e	372	46.1 ^e	1757	54.4 ^e
	Malaria	176	21.8 ^d	276	34.2 ^d	212	26.3 ^d	289	35.8 ^d	953	29.5 ^d
	Insomnia	61	7.6 ^b	26	3.2 ^b	35	4.3 ^b	54	6.7 ^b	176	5.5 ^b
	Noise	88	10.9 ^c	90	11.2 ^c	66	8.2 ^c	83	10.3 ^c	327	10.1 ^c
Medicine used against malaria	Modern medicine	353	43.7 ^a	355	44 ^a	350	43.40 ^a	353	43.70 ^a	1411	43.7 ^a
	Traditional medicine	454	56.3 ^b	452	56 ^b	457	56.6 ^b	454	56.3 ^b	1777	6.3 ^b

Within rows, means followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$, chi-square test).

respondents used the spirals (27.6%) and aerosol sprays (10.7%) to replace the nets. Smoke (2.4%) and local plants (2.4%) were less used (Table 2). The practical use of window net, smoke, local plants, ointment and cover were in similar proportions (Table 2) and the practices have been uniform from one district to another.

The group discussions indicated that most of those treated bed nets came from the campaign conducted by the NMCP to distribute free long lasting insecticide treated nets (LLITN). During group discussions, some participant said: "Mosquito nets were recently distributed to us the poor, so that the whole family can have nets." Another one added: "The free distribution of mosquito nets initiated by the President of the Republic should continue so everyone can have nets." More than half of the population (61%) believed that nets reduced man-mosquito contact (Table 2). Furthermore, 23.7% of respondents made the connection between LLITN and malaria reduction while 11.1% associated LLITN with reduction of others disease (Table 2).

Perceptions and acceptability of populations for IRS

61.5% of total respondents knew IRS (Table 3), but the highest rate was observed in Seme (74%) and the lowest in Dangbo (54.9%). 43.4% of respondents believed that IRS contributed to reducing mosquitoes (Table 3). This was also revealed during the focus group discussion: "When the day of spraying approaches, we are warned and we put pets away. Mosquitoes and other insects such as cockroaches were killed by IRS in treated homes". A low proportion (9.7%) of respondents said that, IRS helped to lower malaria transmission but 66% mentioned no problem with IRS. Furthermore, some respondents attributed bad odors (8.8%) and toxicity (24.1%) to IRS (Table 3). Others responded: "Yes to insecticide spraying, to rid us of mosquitoes that disturb

our peace. But the insecticide dose should be moderate and do not deceive us by using a dye instead of an insecticide. Tell us what product you want to use. No side effects of insecticide on humans and the environment". Moreover, the acceptability rate of IRS was very high (98.7%) in all districts.

Relationship between perception of IRS and sex, level of education and medical practices

The multivariate logistic regression performed to test associations between knowledge of IRS and the 3 covariates of sex, level of education and medical practice indicated that the odds ratio (OR) associated with the sex was 0.62 with 0.53 to 0.74 as interval confidence and p-value = 0.0 (Table 4). This reflected a significant association between sex and knowledge of IRS and showed that women knew IRS better than men. There was also a significant association between educational level and knowledge of IRS (OR = 1.84 [1.58 to 2.15] p-value = 0.0) (Table 4). Literate respondents were more familiar with the IRS than the illiterate. Knowledge of IRS was also significantly associated with the medicinal practice (OR = 0.75 [0.65 to 0.87] p-value = 0.0) used after adjusting for sex and level of education. This association was consistent with a better understanding of IRS among practitioners of traditional medicine than modern medicine. But the association between acceptance of IRS and sex was not significant (OR = 1.18 [0.54 to 2.58]) (Table 5). The acceptance level of IRS in men did not differ significantly from that in women. There was also a non significant association between acceptance of IRS and medicinal practical used (OR = 0.85 [0.45 to 1.59]) (Table 5). However, there was a significant association between educational level and acceptance of IRS (OR = 2.70 [1.27 to 5.74]) (Table 5). The level of IRS acceptance among the literate was significantly higher than among illiterate.

Table 2. Measures used by people to fight against mosquitoes, benefits and disadvantages of ITN according to localities.

Variable	Adjohoun		Dangbo		Misserete		Seme		Total		
	N	%	N	%	N	N	%	N	%	N	
Measures used by people to fight against mosquitoes	Cover	18	2.2 ^b	16	2 ^b	6	0.7 ^a	12	1.5 ^a	52	1.6 ^b
	Impregnated nets	257	31.8 ^e	279	34.6 ^f	241	29.9 ^c	265	32.8 ^d	1042	32.3 ^f
	Local plants	20	2.5 ^b	18	2.2 ^b	21	2.6 ^a	18	2.2 ^a	77	2.4 ^b
	Ointments	9	1.1 ^b	9	1.1 ^b	7	0.9 ^a	7	0.9 ^a	32	1 ^b
	Ordinary nets	168	20.8 ^d	157	19.5 ^d	190	23.5 ^c	180	22.3 ^c	695	21.5 ^d
	Smoke	24	3 ^b	22	2.7 ^b	15	1.9 ^a	17	2.1 ^a	78	2.4 ^b
	Spiral	224	27.8 ^e	225	27.9 ^e	227	28.1 ^c	215	26.6 ^{cd}	891	27.6 ^e
	Spray	84	10.4 ^c	78	9.7 ^c	95	11.8 ^b	88	10.9 ^b	345	10.7 ^c
Benefits of ITN	Window net	3	0.4 ^{ab}	3	0.4 ^{ab}	5	0.6 ^a	5	0.6 ^a	16	0.5 ^{ab}
	Reduction of diseases	94	11.6 ^c	93	11.5 ^c	75	9.3 ^c	95	11.8 ^c	357	11.1 ^c
	Reduction of mosquitoes	494	61.2 ^e	475	58.9 ^e	520	64.4 ^e	480	59.5 ^e	1969	61 ^e
	Reduction of insects	26	3.2 ^b	31	3.8 ^b	30	3.7 ^b	30	3.7 ^b	117	3.6 ^b
	Reduction of malaria	187	23.2 ^d	203	25.2 ^d	177	21.9 ^d	197	24.4 ^d	764	23.7 ^d
Disadvantage of ITN	Others	6	0.7 ^a	5	0.6 ^a	5	0.6 ^a	5	0.6 ^a	21	0.7 ^a
	Any	693	85.9 ^c	693	85.9 ^c	695	86.1 ^c	693	85.9 ^c	2774	85.9 ^c
	Heat	100	12.4 ^b	100	12.4 ^b	95	11.8 ^b	101	12.5 ^b	396	12.3 ^b
	Suffocation	6	0.7 ^a	6	0.7 ^a	6	0.7 ^a	5	0.6 ^a	23	0.7 ^a
	Others	8	1 ^a	8	1 ^a	11	1.4 ^a	8	1 ^a	35	1.1 ^a

Within rows, means followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$, chi-square test).

Table 3. Rate (%) of individuals perceptions and acceptability of populations for IRS.

Variable	Adjohoun		Dangbo		Misserete		Seme		Total		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Knowledge of IRS	Know	459	56.9 ^b	443	54.9 ^b	486	60.2 ^b	597	74 ^b	1985	61.5 ^b
	Do not know	348	43.1 ^a	364	45.1 ^a	321	39.8 ^a	210	26 ^a	1243	38.5 ^a
IRS disadvantage	Any	540	66.9 ^d	534	66.2 ^d	531	65.8 ^d	525	65.1 ^d	2130	66 ^d
	Bad odor	68	8.4 ^b	70	8.7 ^b	73	9 ^b	73	9 ^b	284	8.8 ^b
	Do not know	9	1.1 ^a	8	1 ^a	10	1.2 ^a	10	1.2 ^a	37	1.1 ^a
	Toxic	190	23.5 ^c	195	24.2 ^c	193	23.9 ^c	199	24.7 ^c	777	24.1 ^c
IRS advantage	Do not know	31	3.8 ^b	25	3.1 ^a	19	2.4 ^a	29	3.6 ^b	104	3.2 ^b
	Reduction of disease	91	11.3 ^c	85	10.5 ^b	79	9.8 ^b	108	13.4 ^d	363	11.2 ^d
	Reduction of mosquitoes	335	41.5 ^e	392	48.6 ^d	331	41 ^d	342	42.4 ^f	1400	43.4 ^f
	Reduction of insects	260	32.2 ^d	226	28 ^c	277	34.3 ^c	242	30 ^e	1005	31.1 ^e
	Reduction of malaria	75	9.3 ^c	67	8.3 ^b	90	11.2 ^b	80	9.9 ^c	312	9.7 ^c
	Others	15	1.9 ^a	12	1.5 ^a	11	1.4 ^a	6	0.7 ^a	44	1.4 ^a
IRS acceptance	No	11	1.4 ^a	10	1.2 ^a	13	1.6 ^a	7	0.9 ^a	41	1.3 ^a
	Yes	796	98.6 ^b	797	98.8 ^b	794	98.4 ^b	800	99.1 ^b	3187	98.7 ^b

Within rows, means followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$, chi-square test).

Type of habitat seen and their state

Human dwellings were mostly built with concrete and

mud supports in all four districts (Figures 2 and 3). Indeed, among a total of 5,164 houses surveyed, 54.3% (2,807/ 5,164) were made of cement and 30.5% of clay.

Table 4. Associations between knowledge of IRS and sex, level of study, practice of medicinal.

Covariates	Estimated coef.	p-value	OR and CI 95%
Intercept	0.47652	0.007	
Sex (male)	-0.47167	0.00	0.62 [0.53 - 0.74]
Level (>CM1)	0.61188	0.00	1.84 [1.58 - 2.15]
Medicine (modern)	-0.28839	0.0001	0.75 [0.65 - 0.87]

Level > CM1 (CM1=5th year of primary school): can read and write; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Table 5. Associations between acceptance of IRS and sex, level of study, practice of medicinal.

Covariates	Estimated coef.	p-value	OR and CI 95%
Intercept	4.0713	0.000	
Sex (male)	0.1682	0.673	1.18 [0.54 - 2.58]
Level (>CM1)	0.9940	0.009	2.70 [1.27 - 5.74]
Medicine (modern)	-0.1610	0.616	0.85 [0.45 - 1.59]

Level > CM1 (CM1=5th year of primary school): can read and write; OR: odds ratio; CI: confidence Interval.



Figure 2. A) Mud habitats at Dangbo; B).Habits of bamboo and concrete built side by side in the Aholouyeme district of Seme.

Those that were built of bamboo and wood represented only 11.1 and 3.7% respectively. If Dangbo was characterized by the most modest of houses with the highest proportion of mud huts (40.7%), Seme however, was relatively more advanced with the highest proportion of concrete homes (73.4%) (1,125/ 1,531). While most of the concrete and mud walls (71.5%: 3,693/ 5,164) were smooth with surfaces that lent themselves well to insecticide treatment, 28.4% were rough surfaces. The rough walls were mainly those that were made of clay (30.5%). Only 10% of the houses that were visited had openings that facilitated the entry and exit of mosquitoes (Figures 4 and 5). These were spaces between the wall and roof, cracks through the walls and holes in ceilings.

DISCUSSION

It was observed that majority of respondents have misconceptions regarding the cause of malaria in all localities surveyed. Only 29.5% respondents associated malaria with mosquitoes. Similar to previous studies in Nigeria (Okeke and Okafor, 2008) and in Ndu community of Cameroon (Shey et al., 2011), it was perceived in the culture of southern Benin communities that the sun was one of the major causes of malaria. This has led to malaria being called "disease of the sun" translated in the local language: "Wéssivo zon". Most of the respondents have no idea how mosquitoes acquire parasites and transmit them from one person to the other. These findings

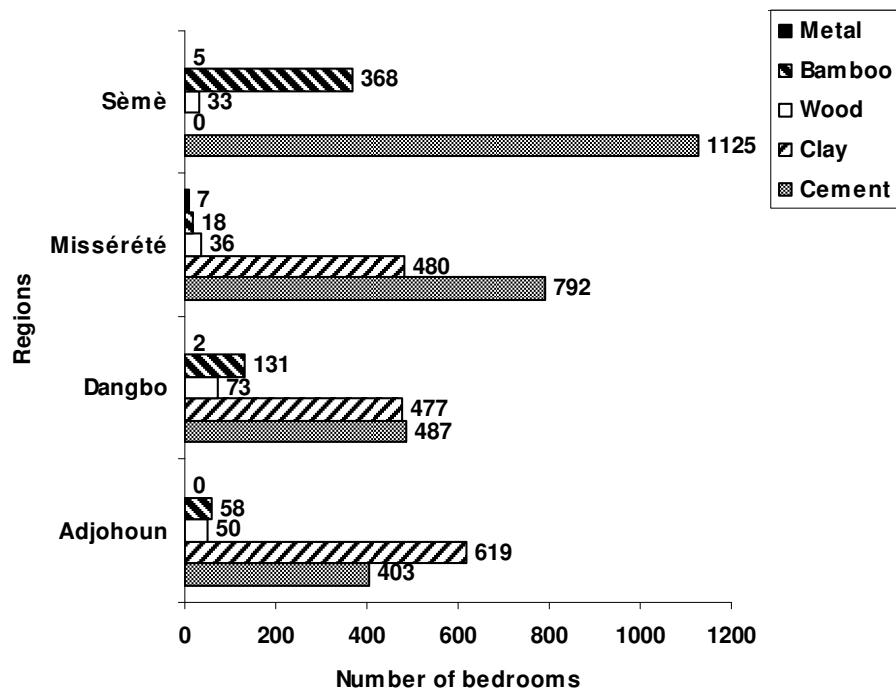


Figure 3. Numbers of habitat types (based on the nature of supports) met in each district (Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme).

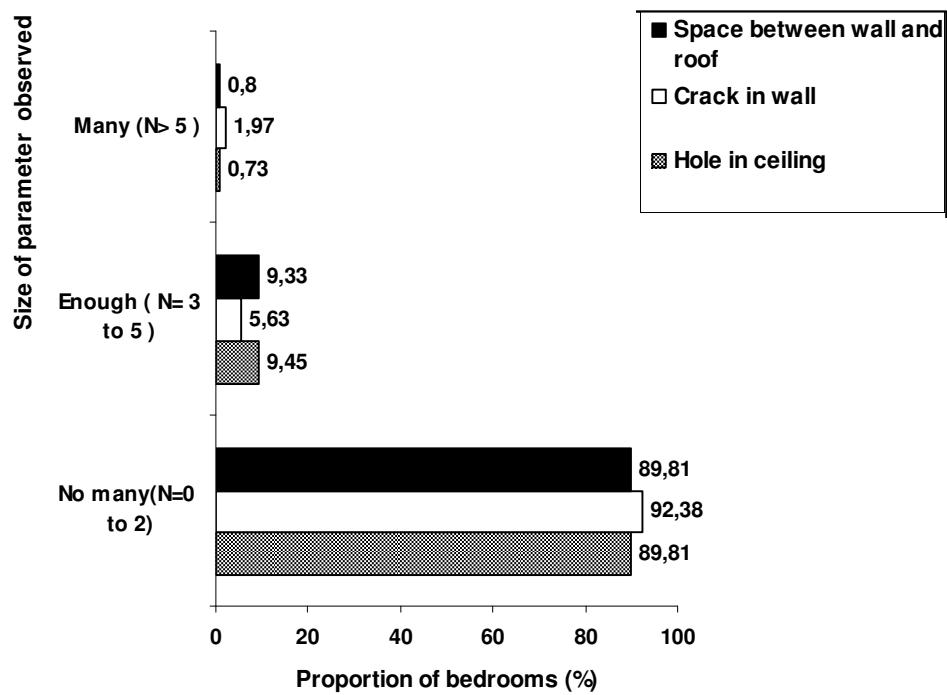


Figure 4. Proportions of sleeping rooms according to whether they are or not fitted with holes in the ceiling, crack in the wall and space between the wall and roof.

suggest a need for a health education program aimed at the local community to enhance the success of IRS. In

the present study, 54.4% of those interviewed mentioned the bite as a main discomfort of mosquitoes. This is



Figure 5. A) Habitat showing a lot of space between the rough wall and the roof with several cracks in the wall (Dangbo); B) habitat with a ceiling and smooth wall without cracks or spaces (Dangbo).

similar to a previous study conducted in Bouake communities, where the major bother was the mosquito nuisance caused by their painful stings and the disturbances of sleep that result from their noise (Doannio et al., 2004).

Otherwise, self-medication was found to be a common practice in the four districts, with the use of traditional medicine or drugs purchased from drug sellers which were administered inappropriately. It is only when home treatment fails that the patient is taken to a health center. This situation confirmed the statistical data of Health Ministry about the use of health services (32, 41, 20 and 40% in Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme respectively). These results were similar to previous studies conducted in Togo (Dermin et al., 1989) and Tanzania (Kinung'hi et al., 2010). The reasons for non-utilization of health facilities in this study could be explained by non-availability of a doctor, poor attitude of staff, lack of access because of cost, prolonged waiting time, unavailability of drugs and distance from home (Igun, 1987; Ruebush, 1995; Okeke et Okafor., 2008). The implementation of IRS is an opportunity to strengthen contacts between the staff of health services and rural communities.

The diversity of practices on vector control in all districts was similar to the findings of Doannio et al. (2004) in Kafine (Côte d'Ivoire). This diversity of practices in the four districts could be explained by the rich experience of the population in home treatment and the promotion of LLITNs justified by the relatively high rate of net use (53.8%) and other means of protection against mosquito bites (spirals and aerosols). These interventions to improve home management in our study community will be very beneficial for implementation of IRS. Nevertheless, it is very surprising that in this study, 23.7% of respondents associated nets and malaria reduction. This could be explained by misconceptions regarding the cause of malaria. However a study conducted in Ghana (Agyepong and Manderson 1999) showed that understanding of an association between mosquitoes

and malaria did not predict bed net usage and that the primary reason for bed net usage pointed to avoidance of the nuisance of mosquito bites and not necessarily for prevention of malaria.

Moreover, the widespread use of spirals and aerosols in the districts surveyed could be justified by the availability on all markets of coils and aerosols, their relatively low cost and the fact that they could be bought on a retail basis. As for the repulsive gas plants, they were rarely used (2.4%) probably because of their short-term of effectiveness. Had it not been the relatively high cost of nets, the utilization rate indicated (53.8%) would have been higher. Furthermore, the heat, suffocation, beliefs and taboos seemed to also be barriers to the use of nets. Previous studies in northern Ghana reported that seasonal factors, patterns of use, and questions of cost were key factors likely to influence the dissemination and effectiveness of bednets (Binka and Adongo, 1997).

The high rate of acceptability of IRS could be explained by the rich experience of the population in home treatment and the promotion of preventive measures against malaria by the Ministry of Health. This acceptability could be also justified by the memory of the benefits of IRS operations, organized by the Ministry of Health between 1983 and 1989 in the south of Benin (Akogbeto, University of Abomey Calavi, Benin, personal communication). However, some had a bit of suspicion especially regarding the toxicity and odor of insecticides. Proper sensitization will reduce community reluctance and the success of indoor residual spraying will strengthen community practices in the fight against malaria.

There was a significant association between sex and knowledge of IRS and showed that women knew IRS better than men. This finding was similar to other studies (Raikes, 1989; Shey et al., 2011) and could be explained by the responsibility of women to provide nursing and health care for children. Men were not present due to farm work. Education level influenced the knowledge of the IRS. Educated respondents were more

knowledgeable than the illiterate (Sharma et al., 2003; Comoro et al., 2003). Moreover, the practitioners of traditional medicine understood IRS better than practitioners of modern medicine. Practitioners of traditional medicine generally live in rural areas where mosquitoes are many and malaria more endemic unlike the practitioners of modern medicine who live in urban environments that are less favorable to mosquitoes. This would justify the fact that they are less familiar protective measures in rural areas (Jones et al., 2007).

The large number of houses built with mud substrates in Dangbo, Misserete and Adjohoun, is due to the low standard of living. This type of mud walls could require the use of large quantities of insecticides during spraying, due to its high porosity. But 71.5% of these walls were plastered with a mixture of sand or cement, which could reduce the degree of porosity. However, at Seme, most of houses were built with cement. This kind of habitat was also found in small proportions in Dangbo, Misserete and Adjohoun, which was an advantage because smooth surfaces were more readily available (Najera and Zaim, 2004). In Seme, there was no lateritic red ground and the soil was mostly sand with vegetation dominated by palms and coconut trees that were used to build homes of bamboo and straw. This situation was similar in a few villages of Dangbo and Adjohoun. These houses made of bamboo and straw often had large openings that facilitated the pollution by insecticide during the spray. The desirable strategy for these types of houses was the use of nets. Another disadvantage encountered in certain households was the juxtaposition of houses of straw and lateritic red ground or cement. This probably means that two separate strategies (LLITN and IRS) will have to be used for the same household.

Conclusion

In conclusion, self-medication was found to be a common practice in Oueme region. The study has revealed reasonable knowledge of preventive measure against mosquitoes; however, there is a need for community intervention program directed towards correcting misconceptions about the cause of malaria. Despite the diversity of tools to prevent against mosquito bites, mosquito nets were used in most of the areas. Commitment to the implementation of a prevention strategy based on IRS is total; 98.7% of those surveyed agreed with the campaign and agreed to participate. A large segment of the houses were conducive to IRS. However, the distribution of LLITN to people was recommended to households that did not meet the conditions for IRS. It was suggested that an entomological and clinical investigation could be conducted as a prelude to the implementation of the IRS to complete the present study. This will help to know the endophilic character of the vector and to assess the effectiveness of the strategy, in order to share the benefits with the vector control programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the PMI (President Malaria Initiative) which supported this study financially through USAID. Also, many thanks to Adango Arnaud, Azondekon Roseric, and Boussari Olayide for their technical assistance.

REFERENCES

- Agyepong IA, Manderson L (1999). Mosquito avoidance and bed net use in the Greater Accra Region, Ghana. *J. Biosoc. Sci.*, 31: 79-92.
- Aikins MK, Pickering H, Greenwood BM (1994). Attitudes to malaria, traditional practices and bed nets (mosquito nets) as vector control measures: a comparative study in five West African Countries. *J. Trop. Med. Hyg.*, 97: 81-86.
- Akogbeto M, Feliho R (1996). Connaissances et attitudes pratiques concernant l'utilisation des moustiquaires à Ganvié. République du Bénin. Bull. OCCGE. Inform., 105 : 10-20.
- Akogbeto M, Yakoubou S (1999). Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2 : 123-130.
- Albou-Ilaty M (2009). Techniques d'échantillonnage en épidémiologie. Université de Poitiers, pp. 14-48.
- Binka FN, Adongo P (1997). Acceptability and use of insecticide impregnated bednets in northern Ghana. *Trop. Med. Int. Health*, 2: 499-507.
- Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P (1999). Pyrethroid cross-resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte D'Ivoire. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 15: 53-59.
- Comoro C, Nsimba SED, Warsame M, Thomson G (2003). Local understanding, perceptions and reported practices of mothers/guardians and health workers on childhood malaria in Tanzania: Implications for malaria control. *Acta. Trop.*, 87: 305-313.
- Corbel V, N'guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbénou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M (2007). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta. Trop.*, 101: 207-216.
- Doanno JMC, Konan Y, Amalaman K, Attiah J (2004). Connaissances, attitudes et pratiques des populations vis-à-vis des moustiques dans la zone urbaine et périurbaine de Bouaké et dans les villages de Kafiné et de Kabolo (Côte-d'Ivoire, Afrique de l'Ouest). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 97(4) : 295-301.
- Deming MS, Gayibor A, Murphy K, Jones TS, Karsa T (1989). Home treatment of febrile children with antimalarial drugs in Togo. *Bull. WHO*, 67: 695- 700.
- Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K (1993). Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.*, 73: 291-294.
- Farid MA (1980). The malaria program from euphoria to anarchy. *WHF*, 1: 28-33.
- Feachem R, Philipps AA (2009). Malaria: 2 years in the fast lane. *Lancet*, 373: 1409-1411.
- Greenberg AE, Ntumbanzondo CM, Malaria L, Howell J, Davachi F (1989). Hospital-based Surveillance of malaria-related Pediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire. *WHO Bull.* 67: 89-196.
- Hla-Shein, Than-Tun-Sein, Soe-Soe, Tin-Aung, Ne- Win, Khin-Saw-Aye (1998). The level of knowledge, attitude and practice in relation to malaria in Oo Do village, Myanmar. Southeast Asia. *J. Trop. Med. Public Health*, 29: 546-9.
- Igun UA (1987). Why we seek treatment here: retail pharmacy and clinical practice in Maiduguri, Nigeria. *Soc. Sci. Med.*, 24: 689,
- INSAE (2004). Institut National de Statistique et d'Analyse Economique. Fichier village Ouémé., Porto-Novo, p. 29.
- Jones AE, Wort UU, Morse AP, Hastings IM, Gagnon AS (2007). Climate prediction of El Niño malaria epidemics in north-west Tanzania. *Malar. J.*, 6: 162.

- Kiniffo IR, Agbo-ola L, Issifou S, Massougbedji A (2000). Les mères des enfants de moins de cinq ans et le paludisme dans la vallée de Dangbo au sud-est du Bénin. *Med. Afr. Noire.*, 47: 27-33.
- Kinung'hi SM, Mashauri F, Mwanga JR, Nnko SE, Kaatano GM, Malima R, Kishamawe C, Magesa S, Mboera LEG (2010). Knowledge, attitudes and practices about malaria among communities: comparing epidemic and non-epidemic prone communities of Muleba district, North-western Tanzania." *BMC Public Health*, 10: 395.
- Krueger R (1994). Focus Groups. A practical guide for applied research. Thousand Oaks: Sage. p. 255.
- Kyawt-Kyawt-Swe, Alan Pearson (2004).Knowledge, attitudes and practices with regard to malaria control in an endemic rural area of Myanmar. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Pub. Health*, 35 : 53-62.
- Le Bras J (1999).Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 92: 236-241.
- MS Ministère de la Santé (2007a). Annuaire des statistiques sanitaires 2006. Direction Départementale de la Santé de l'Ouémé et du Plateau., Porto-Novo, p. 94.
- MS Ministère de la Santé (2007b). Annuaire des statistiques sanitaires 2006. Direction de la Programmation et de la Prospective., Cotonou, p. 209.
- Najera JA, Zaim M (2004). Lutte contre les vecteurs du paludisme. Critères et procédures de prise de décision pour une utilisation raisonnée des insecticides. OMS Genève, p.119.
- Nieto T, Mendez F, Carrasquilla G (1999). Knowledge, beliefs and practices relevant for malaria control in an endemic urban area of the Colombian Pacific. *Soc. Sci. Med.*, 49: 601-9.
- Okeke TA, Okafor HU (2008). Perception and treatment seeking Behavior for Malaria in Rural Nigeria: Implications for Control. *J. Hum. Ecol.*, 24: 215-222.
- Ongore D, Kamunvi F, Knight R, Minawa A (1989). A KAP of rural community on malaria mosquito. *E. Afr. Med. J.*, 66: 79-90.
- Raikes A (1989). Women's Health in East Africa. *Soc. Sci. Med.*, 28: 447-459.
- Ruebush TK, Kern MK, Campbell CC, Oloo AJ (1995). Self-treatment of malaria in a rural area of Western Kenya. *Bull. WHO*, 73: 229-236.
- Sharma AK, Aggarwal OP, Chaturvedi S, Bhasin SK (2003). Is education a determinant of knowledge about malaria among Indian tribal population? *J.Commun. Dis.*, 35: 109-17.
- Seck I, Fall IS, Faye A, Ba O, Tal-Dia A (2008). Connaissances, attitudes et pratiques des femmes sur le paludisme, dans la zone rurale de Popenguine, Sénégal. *Med. Trop.*, 68 : 629-633.
- Shey ND, Longdoh NA, Fouamno KHL, Nguedia AJC, Shey WC, Mboshi NS, Kongnyu NA (2011). Knowledge and practices relating to malaria in Ndu community of Cameroon: Signs and symptoms, causes and prevention. *J. Public. Health Epidemiol.*, 3: 294-300.
- Wayne DW (2005). Biostatistics: A foundation for analysis in the Health Sciences. John Wiley, Sons Inc, p. 782.
- WHO (2010). World Malaria Report. WHO, Geneva.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC (2010). Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar. J.*, 9: 83.
- Yeneneh H, Gyorkos TW, Joseph L, Pickering J, Tedla S (1993). Antimalaria drug utilization by women in Ethiopia: a knowledge-attitudes practice study. *Bull. WHO*, 71: 763.

Full Length Research Paper

Biology of *Anopheles gambiae* and insecticide resistance: Entomological study for a large scale of indoor residual spraying in south east Benin

G. G. Padonou^{1,2*}, M. Sezonlin¹, G. L. Gbedjissi¹, I. Ayi³, R. Azondekon², A. Djenontin^{1,2}, S. Bio-Bangana², O. Oussou², A. Yadouleton², D. Boakye³ and M. Akogbeto^{1,2}

¹Faculte des Sciences et Techniques de l'Universite d'Abomey Calavi, Benin.

²Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin.

³Parasitology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Legon, Accra, Ghana.

Accepted 8 November, 2011

Indoor residual spraying (IRS) has been proposed by the National Malaria Control Programme of Benin in the districts of Adjohoun, Dangbo, Missereete and Seme. Up to date entomological data are unavailable in these districts. To be effective, this measure must be based on the knowledge of biology of the malaria vectors. To achieve this aim, vector collections were made in the study area. A total of 49.059 Culicidae were captured. *Anopheles gambiae* s.s accounted for 20.91% while *Anopheles funestus* accounted for only 0.007%. *An. gambiae* s.s were molecular form M, resistant to DDT and permethrin, but susceptible to deltamethrin (mortality 100%) and bendiocarb (mortality 100%). Endophilic, blood feeding and endophagic rates were respectively estimated to be 65.74%, 53.23 and 70.18%. There was no seasonal variation of longevity, but the entomological inoculation rate ranged from 0 to 0.73 infective bites/ person / night according to localities and seasons. This study confirms a high spatial heterogeneity in mosquito distribution and shows that *An. gambiae* s.s is highly endophagic and endophilic (feed and rest indoor) in south east Benin. While the vector remains susceptible to deltamethrin, high levels of kdr suggest that the use of pyrethrinoid for IRS may be at risk.

Key words: *Anopheles gambiae*, endophily, blood feeding, parturition, entomological inoculation rate, resistance, IRS, Benin.

INTRODUCTION

The number of deaths attributed to malaria in 2008 was estimated to 863,000 of which 89% were in the African regions (WHO, 2009). Efforts, over several years, to control malaria, have given disappointing results. A major reason for failure is the resistance of the parasite, *Plasmodium falciparum*, to drugs and of the vector, *Anopheles gambiae* to pyrethroids used on insecticide-treated (mosquito) nets (ITNs). Since Ivory Coast (Elissa et al., 1993), vector resistance to pyrethroids has been

reported in Kenya, East Africa (Vulule et al., 1994), Burkina (Chandre et al., 1999), South Africa (Hargreaves et al., 2000) and Mali (Fanello et al., 2003). Others studies conducted in Benin (Akogbeto and Yacoubou, 1999; Corbel et al., 2007, Yadouleton et al., 2010) also indicated that *Anopheles gambiae* is highly resistant to pyrethroids and DDT.

The roll back malaria (RBM) partnership was established in 1998 to encourage African countries to take further measures against malaria. In response, Benin adopted a national strategy favoring large-scale, integrated control measures, including ITNs for the protection of vulnerable populations (children under 5 years and pregnant women) and indoor residual spraying

*Corresponding author. E-mail: pagergil@yahoo.fr. Tel: (229) 97289615/ (229) 64848595. Fax: (229) 21308860.

(IRS) with bendiocarb. In support of this decision, the Ministry of Health (MOH) and the president's malaria initiative (PMI) of the USA Government agreed to spread IRS on a regional basis. Initially, four districts (Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme) in the department of Oueme, southern Benin, were selected for IRS. This vector control strategy must be implemented on the basis of valid entomological research. No entomological data from study area was available. Recent data from the neighboring district (Cotonou) in relation with the biology of Culicidae fauna and *An. gambiae* go all the way back to 1950 (Huttel, 1950; Hamon, 1954) and 1992 (Akogbeto, 1992). Thus entomological data were collected, as reference for the monitoring and evaluation of the IRS effectiveness on the dynamic of *Anopheles* populations and their behaviour, on malaria transmission and the insecticide resistance required for a good implementation of the IRS. To achieve this aim field activities and laboratories research were carried out from January 2008 to July 2008. This article reports the results of this entomological study.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study area is located in Republic of Benin (West Africa) and includes four districts of the Oueme region: Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme (Figure 1). The four districts cover an area of 977 km² and an estimated 64,799 households. There are 62,890 children aged <5 years in 174 villages (INSAE, 2004). From 2002 to 2006, Oueme was the region with the highest rates of malaria-associated mortality (MS, 2007). The region is characterized by a sub-equatorial type climate. There are two ecological zones: a plateau zone and a swampy zone. In the present study, the plateau zone is referred to as the "plateau area", and the swampy zone is called "peripheral area" (Figure 1). In the plateau area, mosquito breeding sites are created particularly during the rainy seasons. But the peripheral area is made up of marshy land converted to vegetable gardens. Land management in this vegetable growing area creates perfect breeding site for *An. gambiae*, the main vector of malaria which is highly resistant to pyrethroids (Padonou, 2008). The practice of growing vegetable crops in all districts has resulted in consumption of fertilizers and insecticides. The insecticides used were DDT and pyrethroids until 1970 (Alphacypermethrin, Cypermethrin and Deltamethrin) after the ban of DDT. Because of a high density of mosquitoes in Oueme region, the use of individual and collective measures (aerosol cans, plates for electric diffusers and mosquito coils containing pyrethroids) to protect against mosquito bites is widespread (Akogbeto and Yacoubou, 1999). Houses in both areas are generally built in similar shape. These houses are made of either mud or cement with large eave gaps facilitating entry and exit of mosquitoes.

Field mosquito collection

The sampling was done in 4 villages (2 in the plateau area and 2 in the peripheral area) per district by window traps (WT), indoor and outdoor human landing catches (HLC), indoor pyrethrum spray catches (PSC), and by collection of larvae and pupae.

To estimate endophagy and entomological inoculating rate of *An.*

gambiae, mosquitoes collection by HLC were carried out during 14 surveys from January 2008 to July 2008 (6 in the dry season and 8 in the rainy season) every month for two consecutive nights per survey (8 person-night per district per survey). Teams of collectors were rotated among the collection points on different collection nights to minimize sampling bias. Ethical clearance was granted by the Ministry of Health of Benin and by Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). Informed consent from all volunteers was obtained before their participation in the study. Malaria prevention and curative treatments were provided to all sleepers according to World Health Organization (WHO) recommended regimen on the basis of fever and detectable *P. falciparum* parasitemia.

The exophilic behaviour of mosquito population in the 4 districts was monitored by setting a total of 32 WT with 2 traps per house. Two mosquito catching sessions in each WT were organized each month from 1800 to 0630 h. After collecting exophilic mosquitoes from the WT, pyrethrum spray catches were done to collect indoor resting mosquitoes.

Larvae and pupae were collected from breeding sites of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme within the peripheral area and the plateau, using standard dipping method. Larvae and pupae were reared to adults stage at Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) insectary and subsequently used for bioassays.

Testing insecticide susceptibility

Females *An. gambiae* aged 2 to 5 days old were exposed to WHO diagnostic dosage of various insecticides according to the standard WHO testing protocol (WHO, 1998). The following insecticides were tested: deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%). Mosquitoes were exposed for one hour to insecticide-treated papers and monitored at different time intervals (10, 15, 20, 30, 45 and 60 min) to record the "knock-down". Mortalities were recorded after 24 h and the susceptibility status of the population was graded according to the WHO recommended protocol (WHO, 1998). All susceptibility tests were conducted in the CREC laboratory at 26 to 29°C and 74 to 82% relative humidity.

Dead and surviving mosquitoes were separately stored in individual tubes with silicagel and preserved at -20°C in the laboratory, for further molecular characterization.

Plasmodium falciparum detection and molecular analysis of mosquito samples

Anophelines were sorted and identified to species based on morphological characters using standard identification keys (Gillies, 1968). The physiological age of adult female *An. gambiae* was determined through dissection (Detinova, 1963). The head-thoraces of females from HLCs were tested for the presence of circumsporozoite protein (CSP) of *P. falciparum* using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Wirtz et al., 1987). In each locality, a sub-sample of 25 to 35 *An. gambiae* of the permethrin-tested specimens were processed by PCR concomitantly for identification of species and molecular forms of *An. gambiae* (Favia et al., 2001). Detection of Leu-Phe *kdr* and *Ace-1R* mutations in the same samples were performed by PCR from genomic DNA (Martinez-Torres et al., 1998; Weill et al., 2004).

Estimation of entomological parameters

The following entomological parameters were estimated: (1) Human biting rate (HBR): the number of *An. gambiae* biting a person during

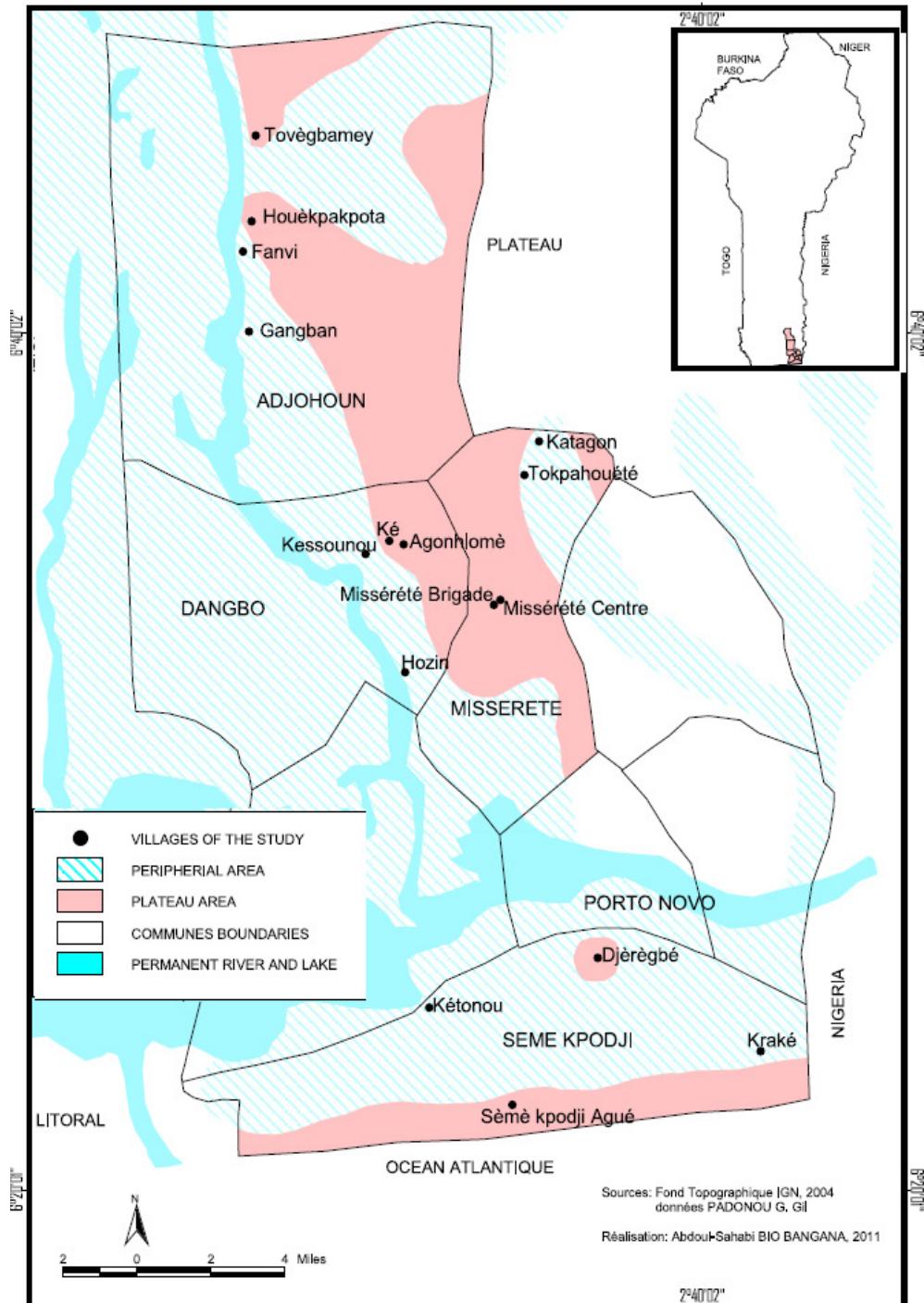


Figure 1. Map of study area.

a given time period (bites/p/t) (time being night, month or year). (2) Endophily rate: the number of *An.gambiae* at rest divided by the total number collected by PSC and the window trap converted to a percentage. (3) Blood-feeding rate: the percentage of blood fed mosquitoes collected divided by the total number collected by indoor PSC and the window trap. (4) Parous rate: the percentage of the number of *An.gambiae* having laid eggs at least once,

divided by the total of *An.gambiae* females dissected. (5) The sensitivity of *An. gambiae* insecticide was defined according to WHO protocol (WHO, 1998). (6) Sporozoite rate: a ratio of the total number of mosquitoes infected divided by the total number of *An.gambiae* dissected. (7) Entomological inoculation rate (EIR): the number of infective bites per person per night is calculated, by multiplying the number of *An.gambiae* bites per person per night by

Table 1. Diversity of mosquitoes species collected at Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme, during the dry (January to March 2008) and rainy (April to July 2008) seasons (2 catch session per month).

Species	Adjohoun		Dangbo		Misserete		Seme		Total
	Nb Ds	Nb Rs	Nb Ds	Nb Rs	Nb Ds	Nb Rs	Nb Ds	Nb Rs	
<i>Anopheles gambiae</i>	124	1219	432	1966	198	1414	388	4518	10259
<i>Anopheles funestus</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	3
<i>Anopheles pharoensis</i>	73	124	337	119	6	7	14	39	719
<i>Anopheles ziemanni</i>	0	0	9	4	0	0	0	5	18
<i>Anopheles coustani</i>	0	1	3	0	0	0	5	0	9
<i>Culex quinquefasciatus</i>	238	370	781	836	14	396	342	205	3182
<i>Culex decens</i>	30	150	187	1804	13	219	874	1640	4917
<i>Culex nebulosus</i>	197	706	100	1417	0	1306	1178	537	5441
<i>Culex thalassius</i>	0	88	41	13	0	0	0	0	142
<i>Culex fatigans</i>	0	0	0	0	0	7	0	0	7
<i>Aedes aegypti</i>	18	15	20	44	25	36	4	7	169
<i>Aedes palpalis</i>	1	15	0	16	3	108	0	0	143
<i>Mansonia africana</i>	7353	2404	7603	2815	1065	452	1793	542	24027
<i>Mansonia uniformris</i>	5	2	3	2	1	2	3	5	23
Total	8039	5095	9516	9037	1325	3948	4601	7498	49059

Nb Ds : Number in dry season ; Nb Rs: Number in rainy season.

the sporozoïte rate.

Statistical analysis

Normality was tested by a Shapiro-Wilk test and we used a rank sum test, Kruskal-Wallis to compare the variables of density, endophagy and aggressivity between localities, between ecological zones and between seasons. ANOVA was used for the analysis of the means of endophily, gravidity and parturity. Comparison of the *kdr* frequency among localities was performed using Fisher's exact test with Genepop software. The significance level was set at 5%.

RESULTS

Species diversity

Four mosquito genera, comprising 14 species, were collected and identified taxonomically: 4 *Anopheles*, 5 *Culex*, 3 *Aedes* and 2 *Mansonia* (Table 1). The Culicidae fauna was present during the dry and rainy seasons and at all localities. However, its composition and size vary. Total culicidae captured was 49,059 of which 38,051 (77.56%) are *Mansonia africana*, *Culex nebulosus*, *C. quinquefasciatus* and *C. decens*. The Anophelines included *An. gambiae* s.l, representing 20.91% of all Culicidae, *An. funestus*, representing only 0.007%, and *An. pharoensis*, *An. coustani* and *An. ziemanni*, at very low percentages.

Endophilic and blood feeding rate

Endophily ranged from 60.9% at peripheral of Adjohoun

to 73.3% at Misserete. The overall comparison of different rates showed no significant difference (Table 2). Endophily was comparable from one locality to another as well as between ecological zones. More than half (53.2%) of the *An. gambiae* caught were blood fed and 38.8% were gravid. Significant variation (Table 2) in blood feeding rate was observed between localities and according to ecological zones (Table 2). In the plateau area blood feeding rate was significantly lower at Misserete (50.7%), Adjohoun (52.4%), Dangbo and Seme (54.3%) than all other localities (Table 2). However, it was higher at peripheral of Dangbo where 70.2% of mosquitoes blood fed. Blood fed females were more common than gravid females throughout the study area (Table 2).

Endophagy

A total of 896 HLC sessions yielded 9,068 *An. gambiae*. 6,364 *An. gambiae* were captured by indoor human landing catch versus 2,704 *An. gambiae* collected outdoors. Endophagy rate was estimated at 70.18% (Table 3), that is approximately 3/4 of the *An. gambiae* sampled preferred to take their meals inside the houses. This relatively high degree of endophagy ranged between 59.78% (Misserete peripheral) and 79.57% (Dangbo plateau) (Table 3) and characterized all localities. There was no significant difference between localities and between ecological zones (Table 3). This requires a prevention strategy against aggressive mosquitoes inside

Table 2. Endophily, blood feeding and gravid behaviour of *Anopheles gambiae* in Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme districts (May to July 2008).

Locality	Total	Npsc	N gravid	N blood fed	Parameter					
					Endophily rate (%)		Gravid rate (%)		Blood feeding rate (%)	
					Mean	[95 %CI]	Mean	[95 %CI]	Mean	[95 %CI]
Adjohoun pl	84	58	26	44	69.45 ^a	[59.07-79.82]	30.75 ^a	[24.09-37.40]	52.38 ^{ab}	[50.37-53.62]
Dangbo pl	84	53	31	46	63.86 ^a	[51.98-75.73]	36.59 ^{ab}	[33.91-39.27]	54.33 ^{ab}	[50.36-58.29]
Misserete pl	84	52	29	43	62.12 ^a	[53.33-70.91]	34.19 ^{ab}	[30.43-37.94]	50.66 ^a	[44.85-56.47]
Seme pl	388	250	142	151	64.38 ^a	[57.59-71.16]	36.60 ^{ab}	[29.66-43.54]	54.33 ^a	[43.74-64.92]
Adjohoun per	91	55	41	61	60.94 ^a	[52.48-69.40]	44.72 ^{cd}	[41.44-47.99]	66.66 ^{cd}	[61.89-71.43]
Dangbo per	82	50	38	57	61.87 ^a	[55.25-68.50]	46.93 ^d	[41.43-52.43]	70.16 ^d	[62.05-78.27]
Misserete per	288	210	120	180	73.30 ^a	[66.95-79.64]	41.83 ^{bcd}	[39.00-44.66]	62.16 ^{bcd}	[58.10-66.22]
Seme per	90	55	35	52	61.38 ^a	[52.19-70.57]	39.02 ^{cd}	[32.81-45.22]	58.33 ^{abc}	[49.19-67.47]
Total	1191	783	462	634	65.74	[62.12-67.20]	38.79	[36.86-40.79]	53.23	[55.99-61.17]

pl: plateau; per : peripheral; C I: 95% Confidence Interval; psc: pyrethrum spray catch; for a same parameter of the table values in column with different superscript were significantly different ($p<0.05$).

Table 3. Human biting rate (HBR) and endophagy of *An. gambiae* by locality and ecological zone.

Locality	Total number	Number of man night	Total number inside	Endophagy (%)
Adjohoun pl	272	112	200	73.52 ^a
Dangbo pl	328	112	261	79.57 ^a
Misserete pl	136	112	88	64.70 ^a
Seme pl	1692	112	1080	63.82 ^a
Adjohoun per	896	112	592	66.07 ^a
Dangbo per	1904	112	1375	72.21 ^a
Misserete per	1104	112	660	59.78 ^a
Seme per	2736	112	2108	77.04 ^a
Total	9068	896	6364	70.18
Ecological zone				
pl area	2428	448	1629	67.09 ^a
per area	6640	448	4735	71.31 ^a

pl: plateau; per : peripheral; for a same parameter of the table values in column with different superscript were significantly different ($p<0.05$).

houses.

Lifespan and infectivity

The parous rate for *An. gambiae* ranged from 68.18 to 80.06% (Table 4a, b). The average parous rate was 77.10% with variations from one locality to another. At Seme peripheral, the parous rate appeared higher (80.06%) but comparable with other localities (Table 4b). At Adjohoun peripheral the rate was lower ($p <0.05$). There was no seasonal variation in longevity. The entomological inoculation rate (EIR) ranged from 0 to 0.73 infective bites per person per night (Tables 4a, b). Projecting this rate throughout the study period, it appears that a man received theoretically between 14.7

and 21 infective bites in 7 months (January to July). However, EIR was higher in Seme (94.5 to 153.3 infective bites in 7 months) and Adjohoun peripheral (100.8 infective bites in 7 months). These infections were obtained between April and July during the main rainy season. Between January and March (main dry season) EIR was zero except Seme plateau and Dangbo plateau (Table 4a) where one person received respectively 3.6 and 1.8 infective bites in three months.

Sensitivity, kdr genotype, species and molecular forms of *Anopheles gambiae*

Bioassays using non-insecticidal papers showed the control mortality rate in wild populations from each locality to be less than 5%. Overall *An. gambiae* showed

Table 4a. Parous rate and entomological inoculation rate of *An. gambiae* s.l. collected by HLC in the plateau area of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme (south of Benin).

Locality	Dry season		Rainy season		January to July 2008
	January to March 2008	April to July 2008			
Adjohoun plateau	N Total	65	207		272
	Parturity %	81.67 ^a	77.25 ^a		79.41 ^b
	HBR	1.35	3.23	[71.68-82.82]	2.43 [75.74-83.07]
	N (ELISA)	58	70		128
	S%	0	5.71		3.12
Dangbo plateau	EIR (b/m/n)	0	0.18		0.07
	N Total	48	280		328
	Parturity %	84.67 ^a	75.75 ^a		79.87 ^b
	HBR	1	[70.99-98.35]	4.375 [60.25-91.25]	2.93 [71.39 -88.34]
	N (ELISA)	48	89		137
Misserete plateau	S%	2.08	4.49		3.64
	EIR (b/m/n)	0.02	0.19		0.1
	N Total	38	98		136
	Parturity %	76 ^a	66 ^a		70.58 ^{ab}
	HBR	0.79	[73.52-78.48]	1.53 [54.31-77.69]	1.21 [63.56 -77.59]
Seme plateau	N (ELISA)	38	78		116
	S%	0	0		0
	EIR (b/m/n)	0	0		0
	N Total	100	1592		1692
	Parturity %	84.67 ^a	76.25 ^a		80 ^b
Seme plateau	HBR	2.08	[78.42-90.92]	24.88 [68.63-83.87]	15.11 [74.49 -85.50]
	N (ELISA)	52	114		166
	S%	1.92	3.5		3.01
	EIR (b/m/n)	0.04	0.87		0.45

N Total: Total number; HBR: Human bite rate; N(ELISA): Number tested by ELISA CSP; S%: Sporozoite index; EIR (b/m/n): Entomological inoculating rate (infected bite/man/night); for a same parameter of the table, values in the dry season and in the rainy season which carry different letters in exposant were significantly different ($p<0.05$). In the column of January to July 08 values which carry different letters in exposant were significantly different ($p<0.05$) from one locality to other locality.

susceptibility to bendiocarb and deltamethrin was observed everywhere: 100% of *An. gambiae* tested were dead (Table 5). PCR has revealed 100% of mosquitoes tested were *Anopheles gambiae* s.s. M form. The frequency of the *kdr* alleles was 79.35% and frequency of *Ace-1* was 0% (Table 6). Furthermore, the survival rate obtained among the *An. gambiae* s.l. populations tested with permethrin was correlated with the frequency of the *kdr* allele (correlation coefficient $R^2 = 0.96$) as shown in Figure 2.

DISCUSSION

The present study provides entomological baseline data in the 4 districts before IRS in Benin. In this study, 14

species of Culicidae: 4 *Anopheles*, 5 *Culex*, 3 *Aedes* and 2 *Mansonia* were collected. In south east Benin (Cotonou and Porto Novo) Huttel (1950) and Hamon (1954) had identified the same species in varying proportions, but without reporting the presence of *Culex fatigans*, *Cx. quinquefasciatus* and *Aedes palpalis*. The factor that could explain the presence of these vectors is urbanization (Hamon et al., 1967). Another author, Akogbeto (1992), reported 8 species in Southern Benin with *Mansonia* sp., *An. gambiae* s.l., *Culex thalassius* and *Culex. gr. decens*. Moreover, Djenontin et al. (2010) revealed 28 different species of Culicidae with *M. africana*, *C. gr. decens*, *C. quinquefasciatus*, *C. nebulosus*, *Anopheles nili*, *An. funestus* s.s. and *Anopheles leesonii* in southwest Benin. The variability in ecological diversity noted by different authors is probably

Table 4b. Parous rate and entomological inoculation rate of *An. gambiae* s.l. collected by HLC in the peripheral area of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme (south of Benin).

Locality	Dry season		Rainy season		January to July 08	
	January to March 08		April to July 08			
Adjohoun peripheral	N Total	59	837		896	
	Parturity %	69.67 ^a [65.87-73.46]	67 ^a [61.34-72.66]		68.18 ^a [65.37 - 70.98]	
	HBR	1.23	13.08		8	
	N (ELISA)	59	170		229	
	S%	0	1.17		0.87	
Dangbo peripheral	EIR (b/m/n)	0	0.15		0.07	
	N Total	384	1520		1904	
	Parturity %	76.33 ^a [64.08-88.59]	71.25 ^a [61.49-81.01]		73.77 ^{ab} [68.31 - 79.22]	
	HBR	8	23.75		17	
	N (ELISA)	109	170		279	
Misserete peripheral	S%	0	4.7		2.86	
	EIR (b/m/n)	0	1.11		0.48	
	N Total	160	944		1104	
	Parturity %	75.67 ^a [70.50-80.84]	74.75 ^a [58.30-91.20]		75.2 ^{ab} [68.33 -82.06]	
	HBR	3.33	14.75		9.86	
Seme peripheral	N (ELISA)	46	93		139	
	S%	0	1.07		0.71	
	EIR (b/m/n)	0	0.15		0.07	
	N Total	288	2448		2736	
	Parturity %	83 ^a [74.04-91.96]	77.75 ^a [69.49-86.01]		80.06 ^b [75.29 - 84.82]	
Seme peripheral	HBR	6	38.25		24.43	
	N (ELISA)	76	124		200	
	S%	0	4.83		3	
	EIR (b/m/n)	0	1.84		0.73	

N Total: Total number; HBR: Human bite rate; N(ELISA): Number tested by ELISA CSP; S%: Sporozoite index; EIR (b/m/n): Entomological Inoculating Rate (infected bite/man/night); for a same parameter of the table, values in the dry season and in the rainy season which carry different letters in exposant were significantly different ($p<0.05$). In the column of Jan.-Jul. 08 values which carry different letters in exposant were significantly different ($p<0.05$) from one locality to other locality.

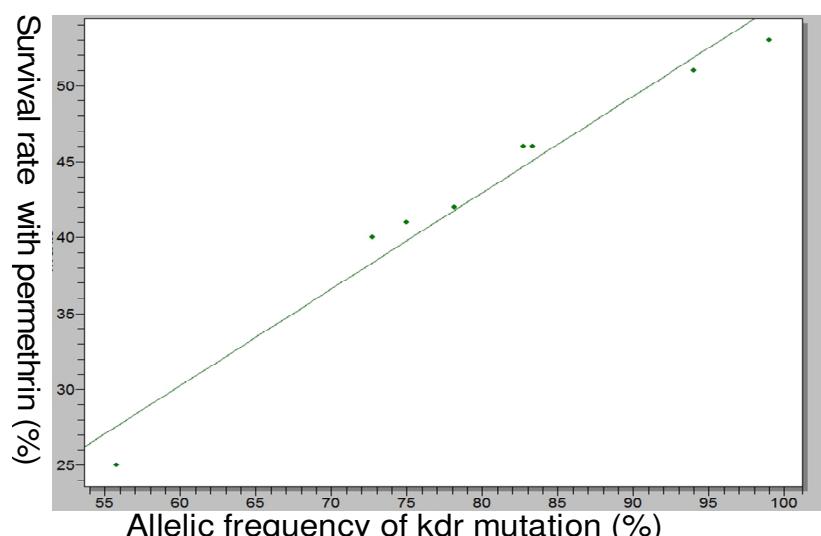


Figure 2. Correlation between *kdr* frequency and survival rates with permethrin.

Table 5. Percentage of dead *Anopheles gambiae* observed after 1 hour exposure to 0.75% permethrin, 0.01% bendiocarb, 4% DDT and 0.05% deltamethrin in the localities of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme (south of Benin) from January to July 2008.

Locality	Permethrin				DDT				Deltamethrin			Bendiocarb		
	% Mort			St	% Mort			St	N	Mort (%)	St	N	Mort (%)	St
	N	Mean	[95% CI]		N	Mean	[95% CI]							
Adjohoun pl	100	60.00 ^b	[54.80- 65.20]	R	100	32.00 ^b	[26.80-37.20]	R	100	100	S	100	100	S
Dangbo pl	100	54.00 ^{ab}	[45.78- 62.22]	R	100	20.00 ^a	[14.80- 25.20]	R	100	100	S	100	100	S
Misserete pl	100	49.00 ^a	[42.91- 55.09]	R	100	22.00 ^{ab}	[13.78- 30.22]	R	100	100	S	100	100	S
Seme pl	100	47.00 ^a	[40.91- 53.09]	R	100	19.00 ^a	[12.91- 25.09]	R	100	100	S	100	100	S
Adjohoun per	100	75.00 ^c	[68.91- 81.09]	R	100	30.00 ^b	[21.78- 38.22]	R	100	100	S	100	100	S
Dangbo per	100	59.00 ^b	[52.91- 65.09]	R	100	23.00 ^{ab}	[13.45- 32.55]	R	100	100	S	100	100	S
Misserete per	100	58.00 ^b	[49.78- 66.22]	R	100	26.00 ^{ab}	[17.78- 34.22]	R	100	100	S	100	100	S
Seme per	100	54.00 ^{ab}	[45.78- 62.22]	R	100	25.00 ^{ab}	[18.91- 31.09]	R	100	100	S	100	100	S
Total	800	57	[54.12- 59.38]	R	800	24.62	[22.49- 26.76]	R	800	100	S	800	100	S

pl: plateau; per : peripheral; N: Number tested; C I : 95% confidence interval ; St: status; R: resistance; S: susceptible; mort : mortality ; For each insecticide, for a same parameter, values which carry different letters in exposant were significantly different ($p<0.05$).

Table 6. Species identification, molecular forms (Mf) and frequency of the *kdr* and *Ace-1* genotypes (RR,RS,SS) in *Anopheles gambiae* s.l. females collected in the localities of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme (south of Benin) from January to July 2008.

Locality	Species		Mf	Kdr mutation				Ace-1 mutation			
	<i>An. gambiae</i> s.s	M Form		RR	RS	SS	F (Kdr)	RR	RS	SS	F (Ace-1)
Adjohoun pl	24	24	24	15	5	4	72.91 ^a	0	0	24	0
Dangbo pl	28	28	28	20	5	3	80.35 ^a	0	0	28	0
Misserete pl	28	28	28	24	4	0	92.85 ^b	0	0	28	0
Seme pl	25	25	25	24	1	0	98 ^{bc}	0	0	25	0
Adjohoun per	26	26	26	07	15	4	55.78 ^a	0	0	26	0
Dangbo per	30	30	30	17	12	1	76.66 ^a	0	0	30	0
Misserete per	28	28	28	16	12	0	78.57 ^a	0	0	28	0
Seme per	29	29	29	25	0	4	86.20 ^{ab}	0	0	29	0
Total	218	218	218	148	54	16	80.16	0	0	218	0

pl: plateau; per : peripheral; for a same parameter of the table values which carry different letters in exposant were significantly different ($p<0.05$).

based on sampling techniques used, periods of study, study area and population dynamics of

mosquitoes under external pressure. The presence of *An. gambiae* s.l. in all localities during the rainy

season and dry season could be explained by the permanent presence and the abundance of small

collections of natural waters. In contrast, the low presence of *An. funestus* in Adjohoun, Dangbo and Misserete could be justified by the richness of the soil in organic matter and human activities that pollute larval breeding sites and makes them less favorable to its multiplication; while this absence in Seme was likely due to soil salinity because of the proximity of the sea. Unlike to studies conducted in Benin (Akogbeto, 1992) and Cameroun (Atangana et al., 2009), in dry season (January, February, March) more Culicidae were captured (Adjohoun: 61.20%; Dangbo: 51.29%) than in rainy season (April, May, June and July) (Adjohoun: 38.8%; Dangbo: 48.71%). This could be explained by the overflow of the Oueme River enlarged by rains from the northern region of Benin. When the waters recede, small pockets of water form, creating favorable breeding sites of *M. africana*, *Culex sp* and the *An. gambiae* in December, January and February. But, the strong tendency for the endophily of *An. gambiae* (Mouchet, 1957) noticed in all localities could be justified by factors including the scarcity of outdoor shelters and the proximity of many breeding sites in the residential area. The endophagy could be justified by the juxtaposition of habitat because of communal lifestyle and the average number of 2.9 persons per bedroom facilitating the taking of human blood meal.

During the study period, the EIR estimated by extrapolation to 164.5, 175.2 and 266.45 infective bites per man per year, respectively for Seme plateau, Dangbo peripheral and Seme peripheral is higher compared to those mentioned by Akogbeto et al. (1992) in southern Benin. In this study, the determination of the sporozoite was not done by ELISA for the presence of the CS protein, but was based on the detection in salivary glands by microscopy which might account for the lowest levels of sporozoite. However these EIRs are similar to those described by Adja et al. (2006) in the savannah zone of Côte d'Ivoire (EIR = 410 infective bites per year) where *An. gambiae*, *An. funestus* and *An. nili* were involved in malaria transmission and in western of Cameroons, where EIRs were estimated at 100.8 infective bites / man / year (Atangana et al., 2009). The number of infective bites per man per year, estimated at 25.55 (Adjohoun plateau, Adjohoun peripheral and peripheral Misserete), 36.5 (Dangbo plateau) and 0 (Misserete plateau) are significantly lower than the values for similar areas in south Benin in 1990 (Akogbeto et al., 1992). These low levels of the EIR are may reflect the widespread use of mosquito coils and promotion of ITNs. Despite these low EIR, the IRS is needed. Because an EIR less than 20 infective bites per man per year is sufficient to maintain a transmission of malaria (Akogbeto, personal communication). The variability of EIR observed in the 4 localities according to the seasons, could be justify by the rarity of *An. gambiae* in dry season.

From the perspective of molecular tools, data analysis confirmed that *An. gambiae* M form is the principal vector

of malaria in the study area. The absence of the S molecular form showed that it must have been the ecological characteristics of the department of Oueme that did not support its selection. The high frequency of *kdr* observed in *An. gambiae* population has confirmed previous studies in south of Benin (Akogbeto and Yacoubou, 1999; Corbel et al., 2007; Yadouleton et al., 2010). The correlation that we observed between the frequency of the *kdr* allele and the survival rate following exposure to permethrin suggests that the substitution type Leu1014 Phe in *An. gambiae* may be a contributing mechanism underlying this resistance (Ranson et al., 2000). This mutation is justified by the fact that the study area is dominated by farming activities and subjected to selection pressure exerted by the pesticides used by farmers to protect their crops (Akogbeto et al., 2005). The promoting of the use of ITNs encouraged by WHO, might have also contributed to this selection pressure of pesticides. The difference between mortality rate to DDT (22.62%) and permethrin (57%) of the study area could be explained by the involvement of other mechanisms resistance such as metabolic resistance (Corbel et al., 2007). The absence of resistance to bendiocarb has confirmed the previous studies carried out by Akogbeto et al. (2010) and Yadouleton et al. (2010).

Conclusion

The present study provides useful information on the mosquito species composition in south east of Benin and supports the feasibility of IRS as an anti-vector malaria control intervention in Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme. *An. gambiae* is highly endophagic, endophilic (feed and rest indoor) and resistant to permethrin and DDT. The choice of pyrethroid treatment of houses is not desired. A possible alternative is the use of bendiocarb, to which we have observed a good sensitivity in the case of *An. gambiae*. In case this product is held there is hope that malaria transmission will be reduced drastically.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative) which supported financially this study through USAID and RTI. The authors would like to thank Dr N'Guessan Raphaël of London School of Hygiene and Tropical Medicine in Cotonou for his helpful suggestions and correction made to the manuscript. We also thank populations of Adjohoun, Dangbo, Seme, and Misserete for their collaboration.

REFERENCES

- Adja AM, N'Goran KE, Kengue P, Koudou GB, Touré M, Koffi AA, 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.

- Akogbéto M (1992). Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin. Thèse de doctorat, Université de Paris XI.
- Akogbéto M, Chippaux JP, Coluzzi M (1992). Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin). Rev. Epidemiol. Sante. Publique., 40: 233-239.
- Akogbéto M, Djouaka R, Noukpo H (2005). Use of agricultural insecticides in Benin. Bull. Soc. Pathol. Exot., 98: 400-405.
- Akogbéto M, Yakoubou S (1999). Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. Bull. Soc. Pathol. Exot., 92: 123-130.
- Akogbéto MC, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A (2010). Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. Malar. J., 9: 204.
- Atangana J, Fondjo E, Fomena A, Tamesse LJ, Patchoké S, Ndjemai MN, Hamadou NMN, Prosper ABN (2009). Seasonal variation of malaria transmission in Western Cameroon highlands: Entomological and clinical investigations. J. Cell. Anim. Biol., 3: 033-038.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P (1999). Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. Bull. WHO., 77: 230-234.
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M (2007). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. Acta. Trop., 101: 207-216.
- Détinova TS (1963). Méthode à appliquer pour classer par groupe d'âge les diptères présentant une importance médicale. Org. Mond. Santé. Sér. Mono., 47.
- Djènontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudéoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F (2010). Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. Parasit Vectors, 3: 83.
- Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K (1993). Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 73: 291-294.
- Fanello C, Petrarca V, della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, Allouche A, Curtis CF, Touré YT, Coluzzi M (2003). The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. Insect. Mol. Biol., 12: 241-245.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. Insect. Mol. Biol., 10: 19-23.
- Gillies MT, De Meillon B (1968). The Anophelinae of Africa south of the Sahara. South. Afr. Inst. Med. Res. Johannesburg, 54: 1-343.
- Hamon J, Burnett G, Adam J P, Rickenbach A, Grjebine A (1967). *Culex pipiens* fatigans Wiedemann, Wuchereria bancrofti Cobbold, et le développement économique de Afrique tropicale. Bull. Org. mond. Santé, 37: 217-237.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M (2000). *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. Med. Vet. Entomol., 14: 181-189.
- Huttel J (1950). Note sur la répartition des moustiques dans le Bas-Dahomey. Bull. Soc. Pathol. Exot., 43: 563-566.
- INSAE(2004). Fichier village Ouémé. Porto-Novo. 29.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect. Mol. Biol., 7: 179-184.
- Ministère de la Santé (2007). Annuaire des statistiques sanitaires 2006.
- Mouchet J, Gariou J (1957). Exophilie et exophagie d'*Anopheles gambiae* Giles 1902, dans le sud Cameroun. Bull. Soc. Pathol. Exot., 3: 446-461.
- Padonou GG (2008). Evaluation en cases expérimentales de l'efficacité de quelques insecticides pyréthrinoïdes, organophosphorés et carbamate en pulvérisation intradomiciliaire. Mémoire de Master d'entomologie appliquée, Université d'Abomey Calavi.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol., 9: 491-497.
- Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Roberts JM, Mount DL, Mwangi RW (1994). Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. Med. Vet. Entomol., 8: 71-75.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M (2004). The unique mutation in *Ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect. Mol. Biol., 13: 1-7.
- World Health Organization (WHO) (1998). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Document WHO/CDS/CPC/MAL/98.12. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization (WHO) (2009). World Malaria Report. World Health Organization, Geneva.
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot T, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG (1987). Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. Bull. WHO., 65: 39-45.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC (2010). Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. Malar. J., 9: 83.

Dramatic Decrease in Malaria Transmission after Large-Scale Indoor Residual Spraying with Bendiocarb in Benin, an Area of High Resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids

Martin Akogbeto, Gil Germain Padonou,* Honore Sourou Bankole, Dorothee Kinde Gazard, and Ghelus Louis Gbedjissi

Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Benin; Faculte des Sciences et Techniques, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, et Faculte des Sciences de la Sante, Universite d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin

Abstract. In 2008, the National Malaria Control Program in Benin implemented a vector control intervention based on indoor residual spraying (IRS). Four districts of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids were sprayed with bendiocarb. More than 350,000 inhabitants have been protected. Entomologic parameters in the control area were compared with those in intervention sites. The study has shown a drastic decrease in the *An. gambiae* biting rate in the sprayed areas. Results of an enzyme-linked immunosorbent assay were negative for *Plasmodium falciparum* antigen during the entire period of the intervention. No household members received infected bites (entomologic inoculation rate = 0 during January–July). Parous rates were low in areas covered by IRS because bendiocarb is not conducive to long-term mosquito survival. Bendiocarb was found to be a good alternative insecticide for IRS in Benin, in areas where *An. gambiae* has developed high resistance to pyrethroids.

INTRODUCTION

Malaria is a major public health problem in Africa. It is the leading cause of morbidity and mortality and of loss of work days.^{1–3} Two methods are currently used to control this disease: indoor residual spraying (IRS) of insecticides and use of insecticide treated nets (ITNs). In sub-Saharan Africa and southern Asia, these two methods have shown good results,^{4,5} but they have their drawbacks.

The main problem with ITNs and IRS is the development of insecticide resistance, particularly pyrethroid-resistance by several populations of *Anopheles gambiae*.^{6–9} In the past decade, the emergence of resistance in populations of *An. gambiae* to common classes of insecticides used in public health has been reported in many countries in Africa, including Côte d'Ivoire,⁶ Kenya,¹⁰ Benin,^{11,12} Niger,¹³ Burkina Faso,¹⁴ Mali,¹⁵ Nigeria,¹⁶ South Africa¹⁷ and Cameroon.¹⁸ In addition, N'Guessan and others¹⁹ have demonstrated a decrease in the efficacy of treated nets and IRS using pyrethroids against *An. gambiae* in a peri-urban area of Benin, where this species has developed high-level resistance to permethrin. In recent reports,^{20,21} widespread distribution of pyrethrinoid resistance in *An. gambiae* was shown in southern Benin, and there was a significant increase level of the *kdr* mutation, which remains the major resistance mechanism detected. A lowest frequency of *Ace-1^R* was recorded during the same study and may be a sign of encouragement to use carbamates or organophosphates as alternative insecticides to pyrethroids for IRS in Benin.

In another study,²² which included four months evaluation of various insecticides in experimental huts, three insecticides (Sumithion 40 WP [Fenitrothion]; Master Quick ZC [mixture of chlorpyriphos, 250 g/L plus deltamethrin, 12 g/L]; and Ficam M [bendiocarb, 800 g/kg]) were effective against pyrethroid-resistant *Anopheles*. However, bendiocarb is the only product that the National Malaria Control Program (NMCP) has selected for the implementation of IRS in Benin because the Master Quick ZC formulation is not approved by the World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme for its use. With regard to Sumithion 40 WP, doubts were raised on its

safety in terms of its secondary effects and odor. This study was conducted at the experimental hut level and it is difficult to extrapolate from these results what might happen at a larger-scale community level.²²

The present study aims to evaluate the entomologic impact after large-scale implementation of IRS with bendiocarb in areas of high resistance to pyrethroids in *An. gambiae*. The NMCP in Africa has usually implemented adapted strategies. However, it is widely recognized that evaluation and routine vector surveillance is a weak component of many national disease control programs. Therefore, it is important to assess the efficiency of the vector control strategies in areas where mosquitoes have developed high-level resistance to pyrethroids.

MATERIALS AND METHODS

Intervention areas. The study was conducted in four districts of Oueme Department (Adjohoun, Dangbo, Seme, and Misserete) in Benin (Figure 1). The first three districts are characterized by the presence of two types of environment. The first environment is a plateau zone situated far from flooding areas. In this study, this zone is referred to as the plateau area or IRS arm. In the plateau area, mosquito breeding sites are created, particularly during the rainy seasons; more than 90% of households have been treated with bendiocarb at a dose of 400 mg/m². The second environment is represented by a swampy zone on the border of the Oueme River and Lake Nokoué. This zone is referred to as the swampy area or long-lasting insecticide-impregnated net (LLIN) arm.

During August–November, the Oueme River and Lake Nokoué, enlarged by rains, overflow their banks and invade the surrounding zones with floodwaters during three months (September–October) every year. In the swampy zone, IRS was not implemented because of the presence of the two bodies of water, which could be at risk for contamination by insecticides. Therefore, LLINs were distributed to these households in this area, and particular attention was given to children less than five years of age and pregnant women. More than five kilometers separate the plateau and swampy areas. This distance is sufficient to avoid the movement of mosquitoes on both sides. However, the human population density is high in both areas, and mosquitoes do not need to travel far to feed.

*Address correspondence to Gil Germain Padonou, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin. E-mail: pagergil@yahoo.fr

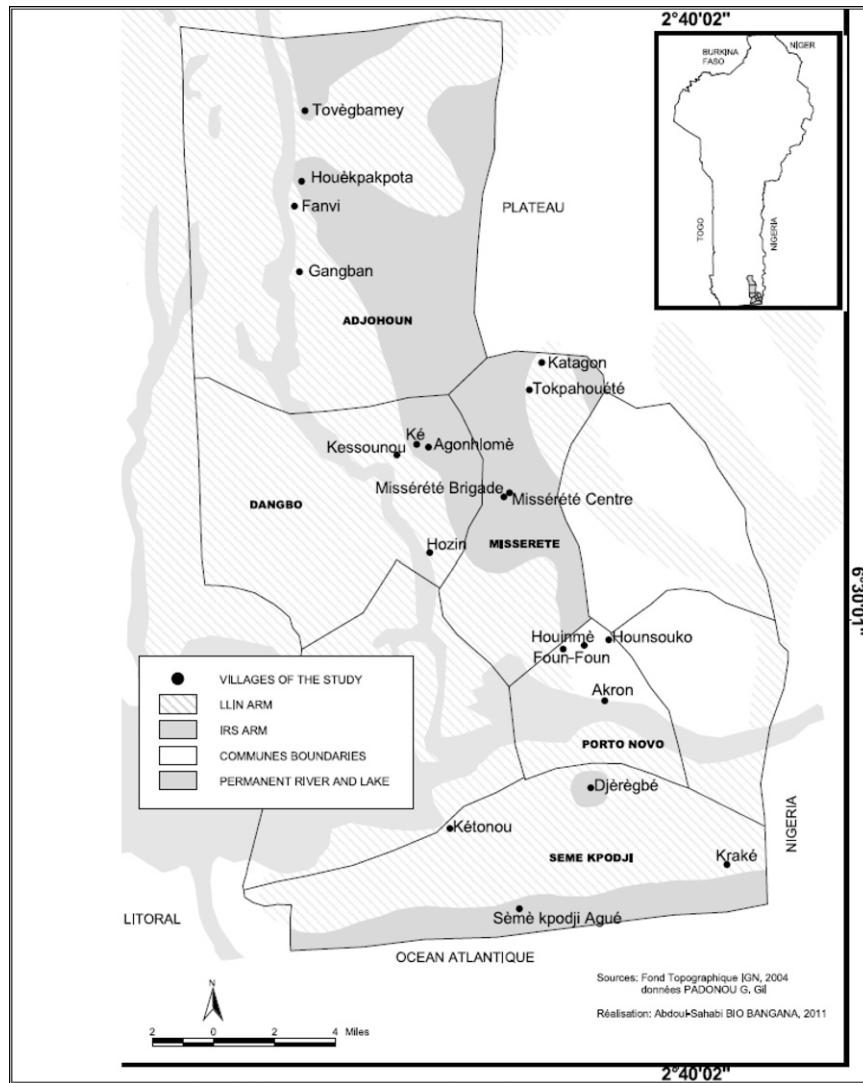


FIGURE 1. Map of the study area in Benin. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

Control area. In a context where universal access to LLINs was promoted, it was not easy to find a good control area. However, Akron, an area that presents the same ecological and geographic characteristics as the four districts mentioned above was chosen as the control area. Akron is a peripheral area of Porto-Novo, the administrative capital of Benin, also in Oueme Department (Figure 1). Before IRS implementation and the free distribution of LLINs, a baseline study was carried out in the four districts selected as intervention sites to collect entomologic parameters. The baseline data is shown for a comparison before and after interventions.

IRS with bendiocarb in the plateau areas (IRS arm). Bendiocarb was selected for spraying on the walls. Studies have shown that this insecticide was efficient in phase II evaluations against malaria vectors.^{22,23} The application dose was 0.4 g/m² of bendiocarb on walls of houses. Two rounds of IRS were carried out: the first in July 2008 and the second, eight months later, in March 2009. The two applications were completed by volunteers selected from the local community and trained by the Research Triangle Institute (RTI) team, the implementing partner of the U.S. Agency for International

Development. According to RTI, the coverage rate was more than 90% for each of the two rounds.

LLINs distributed in the swampy areas (LLIN arm). A total of 48,819 LLINs (Permanet 2.0; Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland) were distributed in October 2008 and May 2009 in the flood zones. They were distributed to 47,524 households. More than 90% of children less than five years of age and pregnant women received LLINs (RTI, unpublished data).

Mosquito sampling. We evaluated anopheline and culicid biting rates inside and outside houses to identify the changes in mosquito biting behavior induced by the presence of bendiocarb on the walls or deltamethrin on the fibers of Permanet 2.0. In each district, two villages were selected per arm, and two houses were chosen per village for mosquito collection to monitor malaria transmission. Adult mosquitoes were collected twice a month by using human landing catches with one collector located inside and another outside in each village. Mosquito collections were carried out every month to monitor the dynamics of *Anopheles* vector density and to evaluate malaria transmission. In addition, we sampled

mosquitoes using morning pyrethrum spray catches and window exit traps to evaluate the impact of interventions on exit induced by the presence of insecticides. In each intervention area, four bedrooms were selected for mosquito collection in the morning.

Laboratory processing of mosquitoes and parameters studied. On the basis of morphologic characteristics in standard identification keys,²⁴ all female mosquitoes belonging to *An. gambiae* complex were identified. Vector species were dissected by using a microscope to determine the physiologic age grading (parous rates) according to the method of Détinova.²⁵ The head and thoraxes of these females from human landing catches were tested by using an enzyme-linked immunosorbent assay according to Wirtz and others²⁶ for the presence of circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. The abdomens of these females were used for identification of species and characterization of molecular forms within the *An. gambiae* complex. This analysis was performed using polymerase chain reaction-restriction fragment length [polymorphism analysis].²⁷

Period of study. The period was conducted during January 2008–December 2009 and spanned two rounds of IRS. To measure the impact of IRS on the biting rate, we compared the values indicated for the same periods, January–July 2008 before IRS and January–July 2009 after IRS. We excluded August–December 2008 and 2009 from the analysis because these two periods were those of IRS implementation, but there is no available database for these periods for before and after intervention.

Statistical analysis. Data were analyzed by using with EPI Info version 6.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) and SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) software. The efficiency of the intervention was tested by using analysis of variance. We calculated the percentage reduction of the human biting rate (HBR) and the entomologic inoculation rate (EIR) after intervention. The chi-square test was used to compare age grading and exit and blood feeding rates during periods before and after intervention. All tests were performed at the 5% significance level.

Ethical approval. This study was approved by the Ministry of Health and the Center for Entomological Research of Cotonou. The voluntary mosquito collectors provided their consent before participating in the study. They were also subjected to regular medical check-ups, given preventive treatments for malaria, and vaccinated against yellow fever.

RESULTS

Effect of IRS on HBR of *An. gambiae*. During the study period, the *An. gambiae* HBR was 1 bite/person/night during the long dry season and 3.5–14 bites/person/night during the long rainy season in the control area. In intervention areas before IRS, the maximums HBRs (9.86 bites/person/night in Misserete₂ and 15.11 bites/person/night in Seme) were observed in January–July. After IRS, the HBRs were reduced for the same period: 95.2% (2.93 to 0.14 bites/person/night) in Dangbo and 89.04% (9.86 to 1.89 bites/person/night) in Misserete₂ (Table 1).

Effect of LLIN on HBR of *An. gambiae*. The reduction in the HBR observed in the IRS arm was also observed after increasing the rate of coverage of LLINs by using additional Permanet 2.0. In Seme before distribution of LLINs, the *An.*

gambiae HBR was relatively high: 24.43 bites/person/night in January–July 2008. This rate decreased to 6.11 bites/person/night after distribution of LLINs (75% reduction) (Table 2). A similar reduction (72.6%) was found in Dangbo. Data obtained in the two arms indicate a higher decrease in the HBR caused by IRS than by LLIN: a 73.66% reduction versus a 50.63% reduction in Adjohoun ($P < 0.05$) and a 95.22% reduction versus a 72.6% reduction in Dangbo ($P < 0.05$) (Tables 1 and 2).

Effects of IRS and LLIN on EIR of *An. gambiae*. Before IRS, the EIR in the control area was 0.07 infected bites/person/night (Table 1). In the IRS arm, similar EIRs were found: 0.07, 0.10, and 0.07 infected bites/person/night in Adjohoun, Dangbo, and Misserete₂, respectively. These values represent 14.7 infected bites per person in Adjohoun, Misserete₂, and Akron during January–July. In Dangbo and Seme, the rate is higher, respectively, 21 and 94.5 infected bites per human during the 7 months. After IRS, all ELISA results were negative for *P. falciparum* circumsporozoite antigen for all districts during the entire study period. However, during this period, each resident of the control area (Akron) received 0.57 infected bites per night (119.7 infected bites during January–July (Table 1).

In the LLIN arm, the mean EIR was 0.07, 0.48, and 0.73 infected bites/person/night in Adjohoun, Dangbo and Seme, respectively, during January–July 2008 (Table 2). After additional LLINs (January–July 2009), a decrease of 83.3% in the EIR was observed in Dangbo (Table 2).

Effects of IRS and LLIN on lifespan of *An. gambiae*. Before IRS, the parous rate of *An. gambiae* was high (mean = 77.1% in areas selected for intervention, range = 70.7% in Misserete₂ to 79.5% in Seme). After IRS, the parous rate decreased to 22.94% for the four districts (Table 3). This decrease was observed in all intervention sites (from 79.5% to 33.3% in Seme and from 75.5% to 26.3% in Misserete₂). In Adjohoun and Dangbo, all *An. gambiae* dissected and microscopically examined were nulliparous. The IRS area was not conducive for mosquito survival. In the LLIN arm, the parous rate decreased from 73.58% before additional LLINs to 55.06% after additional LLINs (Table 3). However, in Adjohoun, the difference was not significant ($P > 0.05$).

Effect of IRS and LLIN on exit of mosquitoes from treated houses after feeding. The natural exit rate of *An. gambiae* varied from 26.7% in Misserete₂ to 36.14% in Dangbo. A similar exit rate (38.12% in Dangbo and 39.05% in Adjohoun) was obtained in the LLIN arm. After IRS, the ext rate was high: 62.5% and 91.7% in Adjohoun and Dangbo, respectively. Compared with the natural exit rate of *An. gambiae*, the difference was significant in all study sites (Table 4). In Misserete₁ and Misserete₂, all mosquitoes were collected from window traps: the exit rate induced by bendiocarb in houses was 100%. The same result was found in the LLIN arm; exit rates were higher after distribution of additional LLINs (Table 4).

Effect of IRS and LLIN on blood feeding. Despite IRS implementation, a non-negligible proportion of mosquitoes fed on humans. However, the blood feeding index was significantly lower after IRS than before IRS (Table 5). A similar result was observed in the LLIN arm. Conversely, in Sème, the blood feeding rates remained high after distribution of LLINs.

DISCUSSION

The indoor residual spraying strategy implemented by the NMCP in the Department of Oueme was successful. In all

TABLE 1
EIR and HBR before and after IRS intervention, Benin*

Location		Before intervention						After intervention					
		Dry season, January–March 2008		Rainy season, April–July 2008		January–July 2008		Dry season, January–March 2009		Rainy season, April–July 2009		January–July 2009	
		95% CI		95% CI		95% CI		95% CI		95% CI		95% CI	
Adjohoun	Total	65	207	272	8	64	64	72	72	112	0.64	0.00–1.28	73.66
	Person night	48	64	112	48	64	64	112	112	0	0	0	100
	HBR	1.35	-0.04 to 2.75	3.23	-1.11 to 7.57	2.43	0.40–4.46	0.17	-0.55 to 0.88	1	-0.14 to 2.14	0.64	0.00–1.28
	S%	0		5.71	3.12	0	0	0	0	0	0	0	
	EIR	0		0.18	0.07	0	0	0	0	0	0	0	
Dangbo	Total	48	280	328	0	0	0	16	16	112	0.14	-0.09 to 0.37	95.22
	Person night	48	64	112	2.93	0.74–5.12	0	64	64	0	0	0	100
	HBR	1	0.69–1.31	4.375	0.91–7.84	3.64	0	0.25	-0.22 to 0.72	0.14	0	0	
	S%	2.08		0.49	0.19	0.10	0	0	0	0	0	0	
	EIR	0.02											
Misserete 1	Total	38	98	136	11	0	0	0	0	11	0	0	100
	Person night	48	64	112	48	64	64	112	112	0	0	0	
	HBR	0.79	0.29–1.29	1.53	0.45–2.61	1.21	0.63–1.80	0.23	-0.76 to 1.22	0	0.00–0.00	0.1	-0.14 to 0.34
	S%	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	EIR	0											
Misserete 2	Total	160	944	1,104	0	0	0	121	121	0	0	0	–
	Person night	48	64	112	48	64	64	121	121	0	0	0	
	HBR	3.33	-1.37 to 8.04	14.75	3.68–25.82	9.86	2.54–17.18	0	0.00–0.00	1.89	-0.40 to 4.18	1.08	-0.25 to 2.41
	S%	0		1.07	0.71	0.71	0	0.84	0.84	0.01	0.009	0.84	87.14
	EIR	0		0.15	0.07	0	0	0	0	0	0	0	
Seme	Total	100	1,592	1,692	29	507	64	112	112	0	0	0	89.04
	Person night	48	64	112	48	64	64	112	112	0	0	0	
	HBR	2.08	-1.34 to 5.50	24.88	-2.11 to 51.86	15.11	-0.72 to 30.93	0.6	-0.33 to 1.54	7.92	-6.65 to 22.49	4.79	-2.21 to 11.78
	S%	1.92		3.5	3.01	0	0	0	0	0	0	0	
	EIR	0.04	0.87	0.45	0	0	0	0	0	0	0	0	
Akron control	Total	48	224	272	50	896	64	112	112	0	0	0	100
	Person night	48	64	112	48	64	64	112	112	0	0	0	
	HBR	1	-1.48 to 3.48	3.5	0.38–6.62	2.43	0.57–4.29	1.04	-0.05 to 2.13	14	-21.57 to 49.57	8.45	-7.52 to 24.41
	S%	0		4.3	2.98	8.16	6.34	0.88	0.88	0.57	6.85	0.57	-248.14
	EIR	0		0.15	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	-7.14

* EIR = entomologic inoculation rate; HBR = human biting rate; IRS = indoor residual spraying; CI = confidence interval; S% = sporozoite index; EIR is given as infected bites/person/night.

TABLE 2
EIR and HBR before and after LLIN intervention, Benin*

Location		Before intervention						After intervention					
		Dry season, January–March 2008			Rainy season, April–July 2008			Dry season, January–March 2009			Rainy season, April–July 2009		
		95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	% Reduction
Adjohoun	Total	59	837	896	64	378	64	442	112	3.95	0.40–7.50	50.63	
	Person night	48	64	112	48	64	64	112	3.95	0.40–7.50	50.63		
	HBR	1.23	0.23–2.22	13.08	0.66–25.49	8	0.23–15.77	1.33	-1.79 to 4.45	5.91	-0.55 to 12.36	0	
	S%	0		1.17	0.87	0.87	0	0		0		0	
	EIR	0	0.15	0.07	0.07	0	0	0		0		0	100
Dangbo	Total	384	1,520	1,904	42	480	480	522					
	Person night	48	64	112	48	64	64	112					
	HBR	8	-17.82 to 33.82	23.75	0.71–46.79	17	3.54–30.46	0.875	-1.59 to 3.34	7.5	0.94–14.06	4.66	0.39–8.94
	S%	0	4.70	2.86	0	0	0	2.20		2.20		1.80	
	EIR	0	1.11	0.48	0	0	0	0.16		0.16		0.08	
Seme	Total	288	2,448	2,736	11	673	673	684					
	Person night	48	64	112	48	64	64	112					
	HBR	6	-13.37 to 25.37	38.25	13.65–62.85	24.43	5.10–43.76	0.23	-0.32 to 0.77	10.52	-2.45 to 23.48	6.11	-1.26 to 13.47
	S%	0	4.83	3	0	0	0	0.9		0.9		0.84	
	EIR	0	1.84	0.73	0	0	0	0.09		0.09		0.05	
Aktron control	Total	1,008	2,208	3,216	390	2,312	2,312	2,702					
	Person night	48	64	112	48	64	64	112					
	HBR	21	-10.35 to 52.35	34.5	-7.27 to 76.27	28.71	9.10–48.33	8.13	-7.74 to 23.99	36.13	-5.53 to 77.78	24.13	1.85–46.40
	S%	2	3.33	3	1.53	1.53	3.57	3.57		3.57		2.92	
	EIR	0.42	1.14	0.86	0.12	0.12	0.12	0.7		0.7		18.6	

* EIR = entomologic inoculation rate; HBR = human biting rate; LLIN = long-lasting insecticide-impregnated net (Permanet 2.0; Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland); CI = confidence interval; S% = sporozoite index; EIR is given as infected bites/person/night.

TABLE 3

Variation of parity rate of *Anopheles gambiae* s.l. collected during the long dry season and the long rainy season in 2008 before IRS and LLIN interventions and in the same subsequent period, Benin*

Location	IRS arm				Comparison of P rate % before and after IRS	LLIN arm				Comparison of P rate before and after LLIN
	No.	P rate %	No.	P rate %		No.	P rate %	No.	P rate %	
Adjohoun	128	79.41	72	0	<i>P</i> < 0.05	229	68.18	121	61.15	<i>P</i> > 0.05
Dangbo	137	78.83	16	0	<i>P</i> < 0.05	279	73.11	166	61.44	<i>P</i> < 0.05
Misserete 1	116	70.68	11	54.54	<i>P</i> > 0.05					
Misserete 2	139	75.53	118	26.27	<i>P</i> < 0.05					
Seme	166	79.51	123	33.33	<i>P</i> < 0.05	200	80.5	118	39.83	<i>P</i> < 0.05
Akron control	134	67.16	175	80.57	<i>P</i> < 0.05	200	80	205	80	<i>P</i> > 0.05
Total	820	76.96	515	22.94	<i>P</i> < 0.05	908	73.58	610	55.06	<i>P</i> < 0.05

* IRS = indoor residual spraying; LLIN = long-lasting insecticide-impregnated net (Permanet 2.0; Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland); No. = no. collected and dissected; P rate % = parity rate %.

districts that used IRS, the density of *An. gambiae* (HBR) and the EIR showed a reduction of 94.4%. *Anopheles gambiae* positive for *P. falciparum* were not found during the evaluation period. This finding is justified by the scale of the campaign. Furthermore, because the four districts were contiguous, spraying covered a large area populated by nearly 350,000 persons. However, although positive results for CS protein were not found, this result does not indicate that malaria transmission was interrupted. Persons likely continued to receive a few infected *An. gambiae* bites. However, the proportion of infected mosquitoes was so low that it would have been necessary to analyze thousands of mosquitoes to find any positive for malaria parasites.

The first challenge for the NMCP, to identify a non-pyrethroid as alternative insecticide for IRS campaigns in Benin, has been achieved. Bendiocarb has emerged as a promising insecticide for the control of vector populations that are resistant to pyrethroids. Many countries, such as Mexico,²⁸ Zimbabwe,²⁹ the Philippines,³⁰ and South Africa,³¹ have decreased malaria effectively by using this product. Previous studies in experimental huts showed that some organophosphates and carbamates were particularly effective on natural populations of vectors that are highly resistant to pyrethroids.³² This result

is the reason why Zaim and Guillet³³ have suggested that the search for control methods other than pyrethroids should be a priority for the NMCP in Africa.

The second challenge for the NMCP, to expand the successful findings for Oueme to other parts of Benin where *An. gambiae* has developed strong resistance to pyrethroids, has also been successful. This success was caused by several factors. In addition to the lethal effect of bendiocarb on mosquitoes that are resistant to pyrethroids,^{19,22} persons who had bed nets, especially children and pregnant women, used them. However, the proportion of consistent users was low. Conversely, IRS sites became inhospitable areas for mosquitoes to survive and most died before the end of the sporogonic cycle of *Plasmodium*. The unpleasant atmosphere created by the presence of bendiocarb on the walls inside houses is harmful to the mosquitoes. This atmosphere results in a decrease in endophily and an increase in the exit rate (Table 4). Thus, some *Anopheles* mosquitoes that managed to enter houses failed to obtain blood meals before exiting. However, some succeeded in obtaining blood meals inside houses (Table 5).

Despite the effectiveness of IRS, this method has its limitations. When mosquitoes enter the houses, even those houses that are treated, they go directly to their host to obtain a blood

TABLE 4

Exit rate for *Anopheles gambiae* from bendiocarb-treated walls and presence of LLINs in houses during the same period (long rainy season), Benin*

Location	Before intervention (May–July 2008)				After intervention (May–July 2009)				Comparison of exit rates before and after intervention	
	Total	No.	Exit rate, %		Total	No.	Exit rate, %			
			Mean	95% CI			Mean	95% CI		
Adjohoun										
IRS arm	84	26	30.17	20.17–40.92	32	20	62.50	39.53–85.47	<i>P</i> < 0.05	
LLIN arm	91	36	39.05	30.59–47.51	72	64	88.89	76.94–100.84	<i>P</i> < 0.05	
Dangbo										
IRS arm	84	31	36.14	24.26–48.01	48	44	91.67	91.67–91.67	<i>P</i> < 0.05	
LLIN arm	82	32	38.12	31.50–44.75	100	48	47.77	39.61–55.92	<i>P</i> < 0.05	
Misserete 1										
IRS arm	84	32	37.88	29.09–46.66	5	5	100.00	100–100	<i>P</i> < 0.05	
Misserete 2										
LLIN arm	288	78	26.7	20.35–33.04	4	4	100.00	100–100	<i>P</i> < 0.05	
Seme										
IRS arm	388	138	35.62	28.83–42.40	0	0				
LLIN arm	90	35	38.62	29.42–47.81	216	142	67.15	61.68–72.44	<i>P</i> < 0.05	
Akron control										
IRS control	88	43	50.42	42.51–58.31	132	64	47.92	43.07–52.76	<i>P</i> > 0.05	
LLIN control	404	188	46.14	42.25–50.02	384	184	49.13	43.65–54.62	<i>P</i> > 0.05	

* Exit rate is the estimated rate of the number of *An. gambiae* that have escaped treated walls and LLINs and are retained in the exit window traps. LLIN = long-lasting insecticide-impregnated net (Permanet 2.0; Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland); No. = number that exited the window trap; CI = confidence interval; IRS = indoor residual spraying.

TABLE 5
Percentage of blood-feeding *Anopheles gambiae* collected in IRS and LLIN arms by pyrethrum spray catch and in exit windows traps before and after interventions, Benin*

Location	Before intervention (May–July 2008)				After intervention (May–July 2009)				Comparison of blood feeding rate before and after intervention	
	Total	No. fed	Blood-feeding rate, %		Total	No. fed	Blood-feeding rate, %			
			Mean	95% CI			Mean	95% CI		
Adjohoun										
IRS arm	84	44	52.38	50.37–53.63	32	11	34.3	4.10–64.40	<i>P</i> < 0.05	
LLIN arm	91	61	66.7	61.90–71.44	72	20	33.3	19.79–46.88	<i>P</i> < 0.05	
Dangbo										
IRS arm	84	46	54.3	50.37–58.30	48	8	16.5	–34.82 to 66.82	<i>P</i> < 0.05	
LLIN arm	82	57	70.2	62.05–78.28	100	22	22	18.35–25.30	<i>P</i> < 0.05	
Misserete 1										
IRS arm	84	43	50.7	44.86–56.48	5	2	41.5	–66.50 to 149.50	<i>P</i> < 0.05	
Misserete 2										
LLIN arm	288	180	62.2	58.11–66.23	4	2	50	50.00–50.00	<i>P</i> < 0.05	
Seme										
IRS arm	388	213	54.3	43.74–64.93	0	0				
LLIN arm	90	52	58.3	49.19–67.47	216	152	72.3	57.13–87.54	<i>P</i> < 0.05	
Akron control										
IRS control	88	52	61.7	49.86–73.48	132	80	60	50.20–69.80	<i>P</i> > 0.05	
LLIN control	404	264	64.3	56.69–71.98	384	200	54.7	43.87–65.46	<i>P</i> > 0.05	

* IRS = indoor residual spraying; LLIN = long-lasting insecticide-impregnated net (Permanet 2.0, Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland); CI = confidence interval.

meal before resting on walls or seeking to escape if the houses are treated. This situation was found in experimental huts for many insecticides²² and at community level.³⁴ This finding is why we have proposed that the NMCP always invite communities in Benin who are protected by IRS to add sleeping under LLINs to supplement malaria control efforts.

The IRS campaign in the Department of Oueme was an initial experience. The plan was to implement IRS strategy in other parts of Benin if initial results were encouraging. Fortunately, not only were the results good, but many communities have expressed appreciation for the strategy.

Implementation of IRS should not exclude use of LLINs by the community. The proportion of fed *An. gambiae* collected in soaked window exit traps was not significantly different from that observed before the IRS. Some families, particularly husbands and wives, usually sleep under bed nets. For these families, bed nets are considered an essential preventive measure. Despite implementation of IRS, these families should be encouraged to use their bed nets. The best strategy is the joint use of IRS plus LLIN. This combination not only protects homes from invasion by mosquitoes, it also prevents contact between humans and mosquitoes. However, such a strategy implicates an increase in the cost of malaria prevention and cannot be implemented everywhere. It must be reserved only for areas with highest levels of malaria transmission. For example, in areas where EIR is approximately 300 *Anopheles* infected bites per year, a 90% reduction is not sufficient to significantly reduce malaria prevalence.

In areas where persons were protected by LLINs, appreciable reductions in biting rates were also observed. The high coverage of LLINs was the major factor for this reduction. In the LLIN area, nets were used systematically because of the nuisance of Culicidae, particularly *Mansonia* spp. and *Culex* spp.³⁵ If widely used, LLINs may be an effective means of vector control^{36–38} and significantly reduce malaria mortality.³⁹

Success of LLINs, despite pyrethroid resistance, may also be justified by the role of mechanical barrier played by this tool.⁴ In addition, efficacy of LLINs could be justified by the results of Chandre and others,⁴⁰ who showed that mosquito nets impregnated with permethrin or deltamethrin had long-

lasting effectiveness against *An. gambiae* in west Africa with kdr-type resistance. These authors reported that pyrethroid-impregnated bed nets provided good levels of protection against kdr homozygous strains of *An. gambiae*. One explanation for this finding is that a high proportion of kdr females are killed by prolonged contact with pyrethroids through diminished sensitivity to the usual irritant and repellent effects, and relatively few kdr females take advantage of this prolonged contact to ingest a blood meal.⁴⁰

After a meeting with all partners involved in malaria vector control in Benin, the NMCP decided to continue to implement this strategy in other regions of Benin. This strategy will now be implemented in the Department of Atacora.

Received November 25, 2010. Accepted for publication July 8, 2011.

Acknowledgments: We thank the American people for supporting our shared goal to reduce the malaria burden in Africa, particularly in Benin, and the Center for Entomological Research of Cotonou team for technical assistance during laboratory bioassays and field collections. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) assisted with publication expenses.

Financial support: This study was supported by the President's Malaria Initiative of the U.S. Government. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene assisted with publication expenses.

Authors' addresses: Martin Akogbeto and Gil Germain Padonou, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin, E-mails: akogbeto@yahoo.fr and pagergil@yahoo.fr. Honore Sourou Bankole, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, Universite d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin, E-mail: bahosour@yahoo.fr. Dorothee Kinde Gazard, Faculte des Sciences de la Sante, Universite d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin, E-mail: kindegazard@gmail.com. Ghelus Louis Gbedjissi, Faculte des Sciences et Techniques, Universite d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin, E-mail: ghelus/louis@yahoo.fr.

Reprint requests: Gil Germain Padonou, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin, E-mail: pagergil@yahoo.fr.

REFERENCES

1. World Health Organization, 2009. *World Malaria Report 2009*. Geneva: World Health Organization.

2. Gentilini M, Caumes E, Danis M, 1993. *Le Paludisme*. Edition Flammarion. Paris: Médecine Tropicale.
3. Ministère de la Santé, 2007. *Annuaire des Statistiques Sanitaires 2006*. Cotonou, Benin: Direction de la Programmation et de la Prospective.
4. Curtis CF, Abraham E, Mnzava P, 1998. A comparison of use of a pyrethroid either for house spraying or for bednet treatment against malaria vectors. *Trop Med Int Health* 3: 619–631.
5. Rowland M, 1999. Malaria control: bednets or spraying? Malaria control in the Afghan refugee camps of western Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 458–459.
6. Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K, 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med Trop* 73: 291–294.
7. Akogbeto M, Yakoubou S, 1999. Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull Soc Pathol Exot* 92: 123–130.
8. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P, 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol* 14: 81–88.
9. Akogbeto M, Djouaka RF, Kinde-Gazard DA, 2006. Screening of pesticide residues in soil water samples from agricultural settings. *Malar J* 5: 22.
10. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA, 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin impregnated nets. *Med Vet Entomol* 13: 239–244.
11. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M, 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 101: 207–216.
12. Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC, 2009. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J* 8: 103.
13. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB, 2008. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide longlasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J* 7: 189.
14. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM, 2002. First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* 44: 157–158.
15. Fanello C, Petrarca V, Delta Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, Allouche A, Curtis CG, Toure YT, Coluzzi M, 2003. The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 12: 241–245.
16. Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M, 2002. Resistance of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 849–852.
17. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M, 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 14: 181–189.
18. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D, 2003. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J Med Entomol* 40: 491–497.
19. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M, 2007. Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* 13: 99–206.
20. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna S, Corbel V, N'Guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC, 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J* 9: 83.
21. Djogbénou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, Weill M, Chandre F, 2010. Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Trop* 114: 116–122.
22. Akogbeto MC, Padonou GG, Gbenou D, Irish S, Yadouleton A, 2010. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J* 9: 204.
23. Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C, 2004. Historical review of malaria control in southern Africa with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health* 9: 846–856.
24. Gillies M, De Meillon B, 1968. The Anophelinae of Africa South of the Sahara. Johannesburg: South African Institute of Medical Research 54.
25. Détinova TS, 1963. *Méthode à Appliquer pour Classer par Groupe d'Âge les Diptères Présentant une Importance Médicale*. Geneva: Organisation Mondiale de la Santé Série Monogr 47.
26. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot T, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG, 1987. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ* 65: 39–45.
27. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C, 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10: 19–23.
28. Arredondo JI, Bow DN, Vaca MA, 1990. Effect of indoor residual spraying of DDT and bendiocarb on the feeding patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 6: 635–640.
29. Mpofu SM, Kanyimo KH, Masendu H, 1991. Potential use of bendiocarb (Ficam VC) for malaria control in an area of Zimbabwe. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 53–542.
30. Asinas CY, Hugo CT, Boase CJ, Evans RG, 1994. Evaluation of selective spraying of bendiocarb (Ficam VC) for the control of *Anopheles flavirostris* in the Philippines. *J Am Mosq Control Assoc* 10: 496–500.
31. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M, 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 14: 181–189.
32. Padonou GG, 2008. *Evaluation en Cases Expérimentales de l'Efficacité de Quelques Insecticides Pyréthrinoïdes, Organophosphorés et Carbamate en Pulvérisation Intradomiciliaire*. Mémoire de Master. Cotonou, Benin: Université d'Abomey Calavi.
33. Zaim M, Guillet P, 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol* 18: 161–163.
34. Georgia BD, Djénontin A, Rogier C, Corbel V, Bio-Bangana S, Chandre F, Akogbeto M, Kindé-Gazard D, Massougbedji A, Henry MC, 2010. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malar J* 9: 380.
35. Akogbeto M, Feliho R, 1996. Connaissances et attitudes pratiques concernant l'utilisation des moustiquaires à Ganvié. République du Bénin. *Bull OCCGE Info* 105: 10–20.
36. Robert V, Carnevale P, 1991. Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou Valley, in Burkina Faso. *Bull Wld Hlth Org* 69: 735–740.
37. Mouchet J, 1991. Pyrethroid impregnated bed nets in malaria control strategy at community level. *Acta Trop* 46: 267–268.
38. Lengeler C, Cattani J, De Savigny D, 1996. *Net Gain, a New Method for Preventing Malaria Deaths*. Geneva: International Development Research Center/World Health Organization.
39. Lengeler C, 2005. *Insecticide Treated Bednets and Curtains for Malaria Control: A Cochrane Review*. The Cochrane Library, Issue 3. Oxford, United Kingdom: Oxford Update Software Ltd.
40. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P, 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol* 14: 81–88.

RESEARCH

Open Access

Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.l.* in Benin

Gil Germain Padonou^{1,2*}, Michel Sezonlin², Razaki Ossé^{1,2}, Nazaire Aizoun^{1,2}, Frédéric Oké-Agbo¹, Olivier Oussou¹, Ghélus Gbédjissi² and Martin Akogbétó^{1,2}

Abstract

Background: In Benin, Indoor Residual Spraying (IRS) and long-lasting insecticidal nets (LLINs) are the cornerstones of malaria prevention. In the context of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids, The National Malaria Control Program (NMCP) has undertaken a full coverage of IRS in a no-flood zone in the Oueme region, coupled with the distribution of LLINs in a flood zone. We assessed the impact of this campaign on phenotypic resistance, *kdr* (knock-down resistance) and *ace-1^R* (insensitive acetylcholinesterase) mutations.

Methods: Insecticides used for malaria vector control interventions were bendiocarb WP (0.4 g/m²) and deltamethrin (55 mg/m²), respectively for IRS and LLINs. Susceptibility status of *An. gambiae* was assessed using World Health Organization bioassay tests to DDT, permethrin, deltamethrin and bendiocarb in the Oueme region before intervention (2007) and after interventions in 2008 and 2010. *An. gambiae* specimens were screened for identification of species, molecular M and S forms and for the detection of the West African *kdr* (L1014F) as well as *ace-1^R* mutations using PCR techniques.

Results: The univariate logistic regression performed showed that *kdr* frequency has increased significantly during the three years in the intervention area and in the control area. Several factors (LLINs, IRS, mosquito coils, aerosols, use of pesticides for crop protection) could explain the selection of individual resistant *An. gambiae*. The *Kdr* resistance gene could not be the only mechanism of resistance observed in the Oueme region. The high susceptibility to bendiocarb is in agreement with a previous study conducted in Benin. However, the occurrence of *ace-1^R* heterozygous individuals even on sites far from IRS areas, suggests other factors may contribute to the selection of resistance other than those exerted by the vector control program.

Conclusion: The results of this study have confirmed that *An. gambiae* have maintained and developed the resistance to pyrethroids, but are still susceptible to bendiocarb. Our data clearly shows that selection of resistant individuals was caused by other insecticides than those used by the IRS and LLINs.

Keywords: IRS, LLIN, Bendiocarb, Deltamethrin, Resistance, *Kdr*, *Ace-1^R*, *Anopheles gambiae*, Benin

* Correspondence: pagergil@yahoo.fr

¹Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Anopheles gambiae Giles (Diptera: Culicidae) is the major malaria vector in West Africa. In Benin it mainly transmits *Plasmodium falciparum* which is responsible for malaria [1]. *An.gambiae* exists in two distinct molecular forms, referred to as 'M' and 'S' based on the variation observed in molecular markers [2]. In sub-Saharan Africa, insecticide treated nets (ITNs) and indoor residual insecticide spraying (IRS) are the cornerstones of malaria vector control [3]. These vector control methods aim to reduce morbidity and mortality caused by malaria. ITNs and IRS have each been shown to be highly effective methods of malaria vector control in their own right. A recent review of the evidence of cost and consequences of large-scale vector control for malaria concluded that both ITNs and IRS are highly cost effective vector control strategies [4]. ITNs have been the mainstay of vector control in many countries in which the disease is endemic and where infrastructure limits or precludes the implementation of IRS [5]. Unfortunately the resistance of *An.gambiae* to insecticides used for malaria vector control has occurred. This resistance has been associated with all insecticidal compounds used for insect vectors of human disease, including African malaria vectors [6]. The ongoing spread of insecticide-resistant genes, such as the well-characterized *kdr* mutations [7,8] in populations of the major African malaria vectors, *An. gambiae* and its sibling species *An. arabiensis* [9-12], can seriously jeopardize the efficacy of vector control programs [13]. It has been shown that in West and West-Central Africa, the L1014F allele was frequent in the S molecular form of *An. gambiae* [9,14,15], whereas only few M form populations from the gulf of Guinea presented *kdr-w* alleles at low frequencies [14,15], except in a few urban and peri-urban coastal areas where it reached high frequencies [16,17]. Several recent studies conducted in Benin [18-21] have also indicated that *An.gambiae* is highly resistant to pyrethroids and DDT, but not to bendiocarb. It is in this context that the National Malaria Control Program (NMCP) has undertaken a full coverage of the IRS in no-flood zones in the Oueme region coupled with the distribution of mosquito treated nets in flood zones. In the situation of vector resistance to pyrethroids, the ability to use other families of insecticides is one of the alternatives available for the malaria vector control. Thus, bendiocarb WP, which gave good results in experimental huts [20], was chosen by the NMCP for the IRS at the community level. Following the first spraying campaign implemented (July/August 2008), three other cycles (March/April 2009, March/April 2010, July/August 2010) of treatment were conducted in the Oueme region. Despite the residual activity of

bendiocarb which was 4 months on cement surfaces [20], the number of rounds in 2008 and 2009 was dependent on financial resources available. IRS was not implemented in the flood zone because of the presence of water bodies, which could be at risk of contamination by insecticides. Therefore, 48,819 LLINs (Long-Lasting Insecticidal Nets, Permanet 2.0) were distributed to 47,524 households, with particular attention to children under-five and pregnant women, in October 2008 and May 2009. A quantity of 35,120 kg of deltamethrin 100% (719.4 mg per net) was contained in 48,819 LLINs distributed in the flood zone. For house spraying, a total of 128,132 kg of bendiocarb 80% was sprayed onto the walls of 166,910 human dwellings to protect a population of 512,491 in a no-flood zone.

Under these conditions, it is possible that the level of initial resistance has changed. Elsewhere in East Africa, no selection effect from the long-term use of ITNs on phenotypic resistance was noticed [22,23], whereas other studies reported a rapid increase of *kdr* mutation after four years of ITNs community use in Kenya [24] and in Equatorial Guinea [17] following a large-scale insecticide residual spraying (IRS) program. There was a similar case in West Africa, where an increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation at the end of 2005 [25] was reported. Other studies have shown the effect of insecticide treated nets (ITNs) with pyrethroids on *An. gambiae* populations and the possible selection of *kdr* alleles either in laboratory experiments [26] or experimental huts trials [27]. In Benin, the susceptibility levels of populations of *An. gambiae* to carbamates and organophosphates, the association of the reported high *kdr* frequency with the resistance phenotype, and the occurrence of other possible mechanisms of resistance are poorly understood. The present study aimed to report the first case of the impact of the three years of large scale of IRS and LLINs interventions on phenotypic resistance, *kdr* and *ace-1^R* alleles in natural populations of *An. gambiae s.l.* from southeast Benin. The results provide crucial information about potential effects of wide-scale IRS and LLIN coverage on *kdr* and *ace-1^R* mutation selection and possible effects on phenotypic resistance to deltamethrin and bendiocarb in order to improve the malaria vector control programs.

Methods

Study area

The study area is located in the Southeast of Benin (West Africa) and includes four districts of the Oueme region: Adjohoun, Dangbo, Misserey and Seme (Figure 1). The four districts covered 977 km² and an estimated

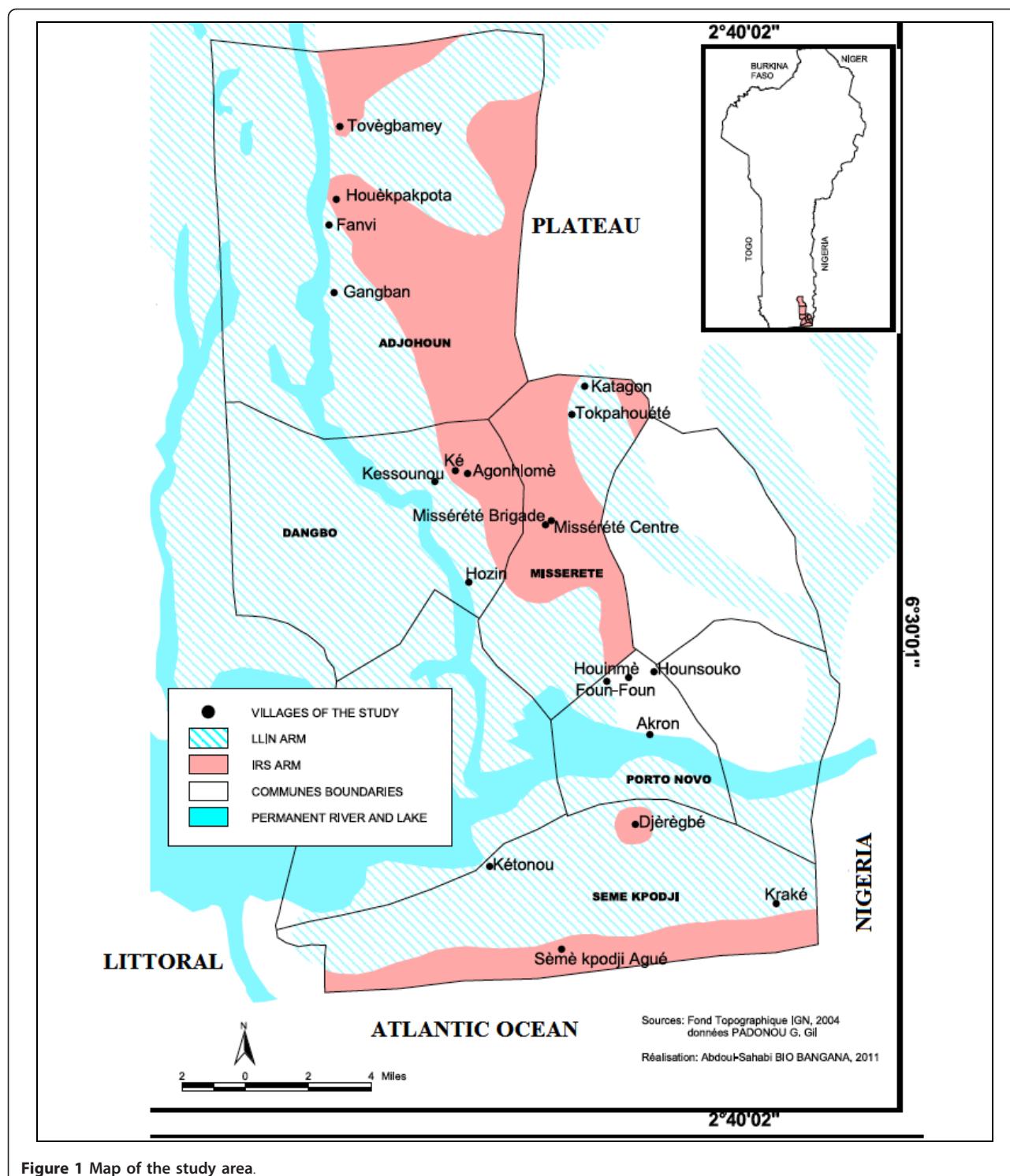


Figure 1 Map of the study area.

64,799 households. Oueme region has a sub-equatorial type climate with a monthly average temperature ranging from 20°C to 34°C and an annual average rainfall between 1,300 and 1,700 mm. Malaria transmission is stable in the Oueme region, which is irrigated by the

river Oueme, Lake Nokoué and the lagoon of Porto-Novo. These streams determine two ecological zones in the Oueme region: a plateau zone and a flood zone. In the present study, the plateau zone is referred to as the "IRS area", and the flood zone is called "LLIN area". An

estimated distance between 5 and 7 km separated the plateau and the flood areas. This distance was sufficient enough to prevent migration of mosquitoes from one area to another. The density of the human population was as high in IRS areas as in the flood zone, so that mosquitoes do not need to fly far away for blood feeding [28]. According to RTI, the coverage rate of IRS was more than 90% for each of the first three rounds.

In a context where universal access to LLINs was promoted, it was not easy to find a good control area. However, Porto-Novo, an area that presents the same ecological and geographical characteristics as the four districts mentioned above was chosen as control.

There is no IRS and free distribution of LLINs in Porto-Novo. Nevertheless some people who had bed nets, especially children and pregnant women, used them, but the proportion of consistent users was low. Before IRS implementation and the free distribution of LLINs, a baseline study of phenotype resistance with *kdr* and *ace-1^R* frequencies in *An.gambiae* populations was carried out in the study area. The baseline data is shown here for a comparison before and after interventions.

Insecticides used for IRS and ITNs

Bendiocarb 80%WP (Wettable powder) was selected for spraying onto the walls in IRS area. The application dose was 0.4 g/m² of bendiocarb on walls of houses. The four applications were implemented by volunteers selected from the local community and trained by the Research Triangle Institute (RTI) team, the implementing partner of the U.S. Agency for International Development. Nets distributed in the flood zones (LLIN area) were PermaNet 2.0. PermaNet 2.0 is a WHO recommended polyester LLIN coated with the pyrethroid deltamethrin to a target dose of 55 mg/m² (\pm 25%).

Study design and mosquito collections

The mosquito sampling was conducted before the implementation of the IRS and LLIN free distribution, to provide baseline data on *kdr* and *ace-1^R* mutation frequency, whereas other collections were carried out during two years after interventions (in 2009, 13 months after the first round of IRS and 11 months after the first LLIN distribution; in 2010, 24 months after the first round of IRS and 23 months after the first LLIN distribution). To carry out this sampling, four villages, including two in the IRS area and two in the LLIN area were randomly selected in each district and two human dwellings were chosen per village for mosquito collection using human landing catches (HLC). Similarly, four villages were chosen in the control area that had received no intervention (two as IRS control area and two as LLIN control area). Adult mosquitoes were

collected twice a month with one collector located inside and another outside in each village. Mosquito collections were carried out twice a month, during three months in the wet season (September to November) in 2007, 2009 and 2010. The same human dwellings were used for HLC during the study and their characteristics were the same throughout the study. Female *An. gambiae* species were morphologically identified using morphological keys [29] and put into microtubes with dessicant, and then stored between -20 and -28°C in the laboratory before processing. Additionally in the same period of wet season in 2007, 2009 and 2010, some larval samples were simultaneously collected. Ten of the previous villages including two in each district of Dangbo and Misserete IRS area, two in each district of Adjohoun and Seme LLIN area, two in the control area were taken into account. In each village selected *An. gambiae* larvae and pupae were collected using the dipping method on several breeding sites (brick pits, pools, marshes, streams, ditches, pits dug for plastering traditional huts, puddles of water, water pockets caused by the passage of cattle and gutters) near human dwellings where the conditions of blood meals are available for Anopheles. The larvae and pupae were kept in separated labeled bottles related to each locality. Some of the larval samples were reared up to adult emergence at the CREC (Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Benin) insectary under standard conditions (25 \pm 2°C; 80% \pm 4%: Relative Humidity), for further bioassay tests. A strain of *An. gambiae* (Kisumu) was used as reference strain to compare the susceptibility levels of the field populations.

Species identification

All mosquitoes collected by HLC and all live and dead specimens of *An. gambiae* from the bioassay test were subjected to the *An. gambiae* species specific PCR assays for species identification [30]. Aliquots of DNA extracted from PCR positive specimens of *An. gambiae* s.s. were subjected to PCR assays for identification of the molecular 'M' and 'S' forms [31].

PCR detection of the *kdr* and *ace.1^R* mutations

Polymerase chain reaction diagnostic test for detection of *kdr* "Leu-phe" mutation was carried out on *An. gambiae* mosquitoes as described by Martinez-Torres *et al.* [7]. The PCR-RFLP diagnostic test was used to detect the presence of G119S mutation (*ace.1^R* gene) as described by Weill *et al.* [32].

Insecticide susceptibility test

The insecticide susceptibility test was carried out before and after the interventions in two districts (Dangbo and Misserete) of the IRS area and in two others districts

(Adjohoun and Seme) for the LLIN area. Female mosquitoes aged 2–5 days old were exposed to diagnostic doses of various insecticides for susceptibility tests using insecticide-impregnated papers, as described by the standard WHO testing protocol [26]. The following insecticides were tested: deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%). The emphasis was also put on deltamethrin, because of a distribution of PermaNets by the NMCP in the swampy area. The use of DDT is justified by the detection of cross-resistance between pyrethroids and organo-chlorine in *Anopheles* populations [9]. Bendiocarb (carbamate) was the insecticide used in the IRS area situated far from flood zone. For each district, five test tubes were used: one untreated paper as a control and four treated papers to expose mosquitoes. Control tubes contained filter papers impregnated with silicon oil (insecticide carrier) only, whereas treated papers were impregnated with diagnostic doses of insecticide plus carrier. An average of twenty-five mosquitoes were introduced into each tube. Females of *An. gambiae* used in this study were exposed for one hour to insecticide-treated papers and monitored at different time intervals (10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) to record the “knock-down” times. After 1 hour exposure, mosquitoes were transferred into holding tubes and provided with cotton wool wet with a 10% honey solution. Mortalities were recorded after 24 hours and the susceptibility status of the population was graded according to the WHO recommended protocol [33]. Dead and surviving mosquitoes from this bioassay were kept separately in Carnoy solution at -20°C for further molecular characterization.

Statistical analysis

Using R software version 2.11.1 [34], a univariate logistic regression, was performed with *kdr* frequency as the dependent variable and the year as a covariate with ANOVA test to determine the association of *kdr* frequency (dependent variable) on the one hand with the localities and also with the years 2007, 2009 and 2010 (covariates) on the other hand. This regression has also been used to appreciate the *kdr* frequency in the intervention areas compared to the control areas. This was the same to test the association between mortality rates (dependent variable) to insecticides and localities (covariates). The ANOVA test was used to assess this association. The Wald test has been used to compare *kdr* frequency and mortality rates in the intervention areas with the control areas. To compare the *ace-1* frequency between the intervention areas and the control areas we used the Fisher exact test (Genepop software) [35] as the gene is rarely observed in mosquitoes tested. Similarly the comparison of the *kdr* and *ace-1* frequencies

from one year to another in each locality was performed using Fisher's exact test and chi-square test. A Kendall correlation test was used to study the correlation between mortality rates and survivors to deltamethrin with *kdr* frequency. The significance level was set at 5%.

Ethical approval

This study received the approval of the Ministry of Health and the National Ethics Committee. The voluntary mosquito collectors gave their consent before participating in the study. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive treatments of malaria. They were all vaccinated against yellow fever.

Results

Species and molecular forms of *Anopheles gambiae*

Species and molecular forms of *An. gambiae* s.l. collected from 2007–10 by HLC are shown in Table 1. During this study, *An. gambiae* s.s was the only member identified in the *An. gambiae* complex. The analysis showed that all *An. gambiae* s.s collected were molecular M form. No S form was found during the study period.

Kdr and *ace-1^R* frequencies in *An. gambiae* s.l. collected by HLC

The *kdr* mutation was the main mechanism of pyrethroid resistance identified in all localities from 2007 to 2010. Univariate logistic regression, performed with *kdr* frequency as the dependent variable and year as a covariate with ANOVA test, showed for the whole IRS area, that the *kdr* frequency was associated with the time ($p < 0.05$) and decreased significantly in 2009 compared to 2007 ($OR = 0.756 < 1$; $p < 0.05$). However, it has increased significantly in 2010 compared to 2009 ($OR = 8.120 > 1$; $p < 0.05$). Conversely, in the LLIN area, the increase in *kdr* frequency was not significant in 2009 compared to 2007 ($OR = 1.295 > 1$; $p > 0.05$) but it was significant in 2010 compared to 2009 ($OR = 5.107 > 1$; $p < 0.05$). Indeed, the *kdr* gene frequencies observed were similar in 2007 and 2009 in Dangbo, Misserete, Adjohoun and Seme LLIN area but had significantly increased in 2010 (Table 1). In the control area the level of *kdr* gene frequencies was very high and stable from 2007 to 2010 ($p > 0.05$). The *ace-1^R* mutation was 0% from 2007 to 2009 in all localities. But in 2010, heterozygous (RS) individuals of *ace-1^R* mutation were detected in all localities 24 months after the first round of IRS, except in Adjohoun, Seme LLIN and control LLIN. This variation (0–13%) was significant in Seme IRS in contrast to insignificant increase ($p > 0.05$) noticed in the localities of Control IRS, Dangbo IRS, Misserete IRS and Dangbo LLIN. A univariate logistic regression with ANOVA test showed that the increase

Table 1 Species identification, molecular forms, *kdr* and *ace-1^R*frequencies in *An.gambiae s.l.* collected by HLC

Localities	Years	N	Ag	Molecular forms	<i>kdr</i> mutation (M form)			<i>ace.1^R</i> mutation (M form)				
					RR	RS	SS	<i>kdr</i> f	RR	RS	SS	<i>ace.1^R</i> f
Control IRS	2007	22	22	22	20	2	0	0.95 ^a	0	0	22	0 ^a
	2009	21	21	21	18	3	0	0.92 ^a	0	0	21	0 ^a
	2010	39	39	39	35	04	0	0.95 ^a	0	5	34	0.06 ^a
Adjohoun IRS	2007	74	74	74	28	34	12	0.61 ^a	0	0	74	0 ^a
	2009	122	122	122	48	56	18	0.62 ^a	0	0	122	0 ^a
	2010	24	24	24	21	3	0	0.94 ^b	0	0	24	0 ^a
Dangbo IRS	2007	150	150	150	85	59	6	0.76 ^a	0	0	150	0 ^a
	2009	263	263	263	133	115	15	0.72 ^a	0	0	263	0 ^a
	2010	68	68	68	65	3	0	0.98 ^b	0	4	64	0.03 ^b
Misserete IRS	2007	89	89	89	58	31	0	0.83 ^a	0	0	89	0 ^a
	2009	129	129	129	86	35	8	0.80 ^a	0	0	129	0 ^a
	2010	46	46	46	43	3	0	0.97 ^b	0	2	44	0.02 ^b
Sèmè IRS	2007	122	122	122	109	1	12	0.90 ^a	0	0	122	0 ^a
	2009	190	190	190	143	17	30	0.80 ^b	0	0	190	0 ^a
	2010	22	22	22	19	3	0	0.93 ^a	0	6	16	0.13 ^b
Control LLIN	2007	150	150	150	110	40	0	0.87 ^a	0	0	150	0 ^a
	2009	101	101	101	90	11	0	0.95 ^b	0	0	101	0 ^a
	2010	43	43	43	38	5	0	0.94 ^b	0	0	43	0 ^a
Adjohoun LLIN	2007	52	52	52	14	30	8	0.56 ^a	0	0	52	0 ^a
	2009	24	24	24	8	16	0	0.67 ^a	0	0	24	0 ^a
	2010	17	17	17	15	2	0	0.94 ^b	0	0	17	0 ^a
Dangbo LLIN	2007	124	124	124	66	54	4	0.75 ^a	0	0	124	0 ^a
	2009	96	96	96	50	40	6	0.73 ^a	0	0	96	0 ^a
	2010	58	58	58	55	3	0	0.97 ^b	0	3	55	0.02 ^a
Sèmè LLIN	2007	72	72	72	60	0	12	0.83 ^a	0	0	72	0 ^a
	2009	44	44	44	31	12	1	0.84 ^a	0	0	44	0 ^a
	2010	7	7	7	7	0	0	1 ^a	0	0	7	0 ^a

Ag: *An. gambiae*; *kdr* f: *kdr* frequency; *ace.1^R* f: *ace.1^R* frequency. Numbers in the same column sharing the same superscript do not differ significantly ($p > 0.05$)

of *kdr* frequencies is associated with the intervention areas and similarly with the control area ($p < 0.05$). As the *ace-1^R* allele was rarely observed in mosquitoes tested, the Fisher exact test, revealed that the *ace-1^R* frequency was similar in the intervention communities compared to the control area ($p > 0.05$).

Insecticide susceptibility

The susceptibility of adult mosquitoes (reared from larval collection) to permethrin (0.75%), deltamethrin (0.05%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%) from 2007-10 is presented in Figure 2. The resistance status of the mosquitoes was based on the decrease in the mortality rates according to WHO criteria. From 2007-10, the susceptible strain Kisumu of *An. gambiae* displayed mortality rates above 98% for the 4 insecticides tested (Figure 2). The 24 h post-exposure mortality rate of *An. gambiae s.l* from all localities showed resistance to

DDT, permethrin and deltamethrin. In contrast, these mosquitoes were highly susceptible to bendiocarb with a mortality rate more than 99% (Figure 2). Univariate logistic regression, performed with mortality rate as the dependent variable and localities as a covariate with ANOVA test, showed that the phenotypic resistance to DDT and pyrethroid was associated with the localities ($p < 0.05$). Indeed, logistic regression performed, showed a decrease of mosquito

susceptibility for permethrin ($OR = 0.70 [0.51 - 0.95]$), $p < 0.05$), deltamethrin ($OR = 0.27 [0.15 - 0.51]$), $p < 0.05$ and DDT ($OR = 0.16 [0.11-0.24]$), $p < 0.05$) in Seme LLIN and for DDT ($OR = 0.54 [0.39 - 0.75]$), $p < 0.05$) in Adjohoun LLIN. This finding was similar to Misserete IRS for permethrin ($OR = 0.53 [0.39 - 0.72]$), $p < 0.05$), deltamethrin ($OR = 0.27 [0.15 - 0.51]$), $p < 0.05$) and DDT ($OR = 0.47 [0.34 - 0.66]$), $p < 0.05$), to Dangbo IRS for permethrin ($OR = 0.63 [0.47 - 0.84]$), p

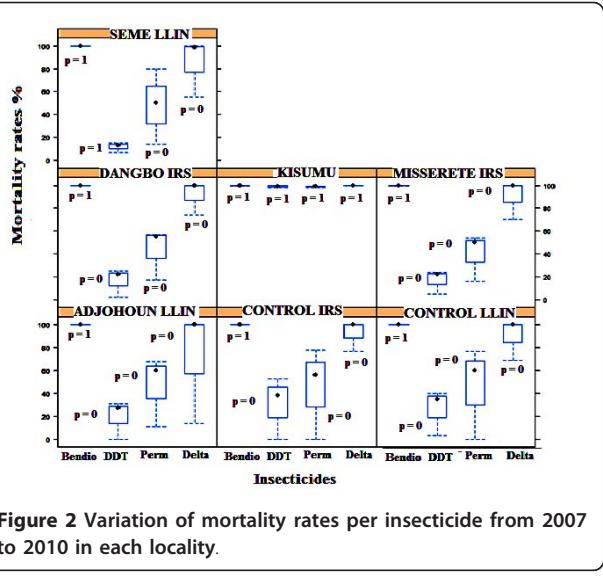


Figure 2 Variation of mortality rates per insecticide from 2007 to 2010 in each locality.

< 0.05) and DDT (OR = 0.51 [0.37 - 0.71]), $p < 0.05$ compared to the control IRS area. Concerning the mortality rate of *An. gambiae* to deltamethrin (OR = 0.51 [0.26 - 1]) and permethrin (OR = 0.82 [0.6 - 1.12]) in Adjohoun they were similar ($p > 0.05$) to the control LLIN area. The susceptibility to bendiocarb did not

change in the LLINs and IRS areas compared to the control area ($p > 0.05$).

Kdr and ace.1^R frequencies in survivors and dead (susceptible) *An. gambiae* s.l. to insecticides

Ace-1^R mutation was not detected in 2 survivors and all 200 randomly drawn dead mosquitoes from the reared strain of *An. gambiae* s.l specimens which were scored for the allele. The *kdr* genotyping performed on dead and surviving mosquito specimens to deltamethrin showed that 100% of them were *An. gambiae* s.s M form. During the study period, *kdr* frequencies in alive and dead mosquito specimens from Dangbo IRS, Misserete IRS, Seme LLIN and Control area have been relatively high and has not varied significantly ($p > 0.05$) (Tables 2, 3). *Kdr* frequencies were respectively in the range of 0.78-0.91 for alive and 0.72-0.90 for dead mosquitoes (Tables 2, 3). Whereas in the Adjohoun LLIN area, it was stable at 0.60-0.64% in 2007-09 and varied to 0.83 in 2010 for live specimens (Table 2). This is the same with the *kdr* allelic frequencies in dead mosquitoes, specimens which were in the range of 0.67-0.66% in 2007-09 and varied to 0.77 in 2010 (Table 3). The correlation coefficients between the *kdr* frequency in survivors and mortality rates to deltamethrin were respectively -0.54 ($P > 0.05$),

Table 2 *Kdr* frequency in surviving *An.gambiae* s.l. population 24 h post-exposure to insecticides

Locality	Years	Number of survivors tested	Species Ag	Molecular forms M	<i>kdr</i> mutation			
					RR	RS	SS	<i>kdr</i> frequency (%)
Control area (Plateau zone)	2007	27	27	27	21	6	0	0.89 ^a
	2009	30	30	30	24	6	0	0.90 ^a
	2010	25	25	25	22	3	0	0.86 ^a
Control area (Flood zone)	2007	25	25	25	21	4	0	0.92 ^a
	2009	28	28	28	23	5	0	0.91 ^a
	2010	25	25	25	22	3	0	0.82 ^a
Adjohoun (LLIN area)	2007	50	50	50	22	20	8	0.64 ^a
	2009	30	30	30	11	14	5	0.60 ^a
	2010	24	24	24	16	8	0	0.83 ^b
Dangbo (IRS area)	2007	58	58	58	37	17	4	0.78 ^a
	2009	60	60	60	38	22	0	0.82 ^a
	2010	25	25	25	19	6	0	0.88 ^a
Misserete (IRS area)	2007	56	56	56	40	16	0	0.86 ^a
	2009	30	30	30	23	6	1	0.87 ^a
	2010	22	22	22	18	4	0	0.91 ^a
Seme (LLIN area)	2007	54	54	54	49	1	4	0.92 ^a
	2009	21	21	21	19	2	0	0.95 ^a
	2010	25	25	25	20	5	0	0.90 ^a

Ag: *An. gambiae*; Numbers in the same column sharing the same superscript do not differ significantly ($p > 0.05$)

Table 3 *Kdr* frequency in dead *An.gambiae* s.l. population 24 h post-exposure to insecticides

Locality	Years	Number of dead tested	Species Ag	Molecular forms M	<i>kdr</i> mutation			
					RR	RS	SS	<i>kdr</i> frequency (%)
Control area (Plateau zone)	2007	27	27	27	20	7	0	0.87 ^a
	2009	30	30	30	22	8	0	0.87 ^a
	2010	25	25	25	20	3	2	0.86 ^a
Control area (Flood zone)	2007	25	25	25	20	5	0	0.90 ^a
	2009	28	28	28	20	8	0	0.86 ^a
	2010	25	25	25	19	3	3	0.82 ^a
Adjohoun (LLIN area)	2007	50	50	50	21	25	4	0.67 ^a
	2009	30	30	30	15	10	5	0.66 ^a
	2010	24	24	24	14	9	1	0.77 ^b
Dangbo (IRS area)	2007	58	58	58	33	19	6	0.73 ^a
	2009	60	60	60	34	22	4	0.75 ^a
	2010	25	25	25	15	6	4	0.72 ^a
Misserete (IRS area)	2007	56	56	56	39	17	0	0.85 ^a
	2009	30	30	30	22	6	3	0.81 ^a
	2010	22	22	22	18	4	3	0.80 ^a
Seme (LLIN area)	2007	54	54	54	45	5	4	0.88 ^a
	2009	21	21	21	15	5	1	0.83 ^a
	2010	25	25	25	19	4	2	0.84 ^a

Ag: *An. gambiae*; Numbers in the same column sharing the same superscript do not differ significantly ($p > 0,05$)

-0.43 ($P > 0,05$) and 0.84 ($P < 0.05$) in 2007 year, 2009 and 2010.

Discussion

The results have shown that *An. gambiae* s.s. M form was the major malaria vector species biting in the Oueme region. This corroborates previous reports [21] of the anopheline distribution in southeast Benin, which explained the absence of the S molecular form by the ecological characteristics of the Oueme region that did not support its selection. The findings have also shown that *kdr* gene frequencies were stable from 2007 to 2009 in the LLIN area but had significantly increased in 2010. Despite the LLIN distribution, the cause of this stability of *kdr* gene frequencies from 2007 to 2009 is unknown, because the same results were obtained in the control area that has not benefited from the distribution of LLINs. But, a similar trend reported by a study in Bioko between 1998 and 2001 showed no evidence of *kdr* in the *An. gambiae* s.s. population despite the use of pyrethroid-impregnated bednets [36]. It was on the basis of this study that the decision was made to implement IRS with a pyrethroid insecticide in Bioko [37]. However, in 2010, a significant increase of *kdr* mutation frequency

was observed in Dangbo, Misserete, Adjohoun and Seme LLIN around 23 months after the first LLIN distribution, and 16 months after the second. This increase was corroborated with the strong correlation (correlation coefficient $R^2 = 0.84$; $P < 0.05$) between the *kdr* frequency and the survival rate obtained among the *An. gambiae* s.l. populations tested with deltamethrin. Indeed the main mechanism of resistance to pyrethroids is the mutation Leu 1014F *kdr* allele in Benin. Recent studies have shown that this mutation is expanding in the South [21,38] and North Benin [38]. This high mutation could explain the resistance to deltamethrin in *An. gambiae* collected from HLC and breeding sites of all localities including the control area, in 2010, two years after the implementation of vector control. Similarly, the resistance to permethrin and DDT has been maintained and became higher. These findings corroborate previous studies that had reported resistance of *An. gambiae* to DDT and permethrin in Benin [18,21,39] and in Ethiopia [40] to DDT, permethrin and deltamethrin. Although suspected, the selective pressure exerted by the promotion of mosquito nets by the Ministry of Health and the free distribution of LLINs in the Oueme region, causing the *kdr* increase within *An. gambiae*

populations is doubtful. Because the findings showed a significant decrease in deltamethrin mortality rates from 85% to 46% in LLIN area and 32% to 22% in IRS area and control area. Other previous studies have shown that the selection of resistance to pyrethroids in the populations of malaria vectors was due to the extensive use of LLIN [41,42]. Hence, resistance selection in the *An. gambiae* population to deltamethrin seemed most likely to have been developed as a consequence of exposure of adult mosquitoes to this insecticide from LLINs distributed in LLIN areas. Moreover, the high domestic pyrethroid use [18,21], the contamination of soil by using pesticides for crop protection [18] in the Oueme region, could justify the resistance to deltamethrin in control and IRS areas who had not benefited from the distribution of LLINs. This hypothesis was supported by previous studies in Mali that showed an increase in *kdr* frequencies in the absence of any wide-scale control program [12]. This diversity of factors (LLINs, IRS, mosquito coils, aerosols, use of pesticides for crop protection) that select individual resistant *An. gambiae* could also explain the spatial variation of low susceptibility of mosquitoes to insecticides. *Kdr* resistance gene was not the only mechanism of resistance observed in the Oueme region. This could justify the highest *kdr* frequency observed among the strain susceptible to deltamethrin. According to previous studies in Benin, high activity of esterases and oxidases was detected in populations of *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus* resistant to pyrethroids [26]. Hence, further investigations are required to determine the role of *kdr* in conferring resistance and the presence of other resistance mechanisms involved in the different classes of insecticides [43]. Indeed, when exposed to several insecticides, *An. gambiae* develops a resistance to these chemicals through several mechanisms of adaptation. Therefore, major challenges to malaria control in Africa must include the monitoring of resistance of mosquitoes to insecticides, but should also involve the education of people on the appropriate use of insecticides.

After four rounds of bendiocarb IRS from 2008 to 2010, *An. gambiae* remained susceptible to bendiocarb. This finding is in agreement with a previous study conducted in Benin [20,21,44] and in Bioko where the number of *An. gambiae* s.s. exiting through window traps were significantly reduced and remained low with subsequent IRS rounds with a bendiocarb [4]. This susceptibility of *An. gambiae* to bendiocarb may be explained by the absence of individual homozygous RR in the Oueme region. In *Culex pipiens* populations the *ace-1* mutation has been associated with a high fitness cost [45] and the same may be true in *An. gambiae* s.s. as the frequency of the *ace-1* mutation in mosquito populations declines rapidly after a few generations in the

absence of selection pressure from organophosphates or carbamates insecticides [46]. Similarly, Djogbenou *et al.* reported that the main cost of resistance found for *An. gambiae* mosquitoes homozygous for the G119S mutation was that they were significantly more likely to die during pupation than their susceptible counterparts [47]. But after the fourth round of IRS in 2010 heterozygous (RS) individuals of *ace-1* mutations were detected in a few localities, with a significant variation (0-13%) of *ace-1* frequency in Seme IRS in contrast to insignificant increase ($p > 0.05$) noticed in the localities of Control IRS, Dangbo IRS, Misserete IRS and Dangbo LLIN. This occurrence of heterozygous individuals, in the intervention area in 2010 could be attributed to a high selection pressure, because two rounds of IRS had been carried out that year. However, the occurrence of heterozygous individuals even at sites far from the sprayed areas, suggests other factors than those exerted by the vector control program. The *ace-1* mutation may have migrated from treated to untreated areas, explaining the parallel increase in those areas. Conversely, the greater frequency of *ace-1* mutation in *An. gambiae* specimens in Seme IRS, despite the fact that they are interspersed by at least 5 km with untreated control area and LLIN area, may suggest a possible migration of *ace-1* mutation to untreated areas. If migration is restricted, the selection pressure in the untreated areas may be caused by other than the one induced by IRS. Indeed, recent studies [18,48] showed that this region has a different bioclimatic characteristic with high rainfall (1,500 mm annually), where insecticides are extensively used for agriculture. This suggests that selection of resistant individuals has been caused by insecticides used for other purposes apart from those used by the IRS, although it is difficult to identify the specific activity with the present study.

Conclusion

The results of this study have confirmed that natural populations of *An. gambiae* in the Oueme region have maintained and developed their resistance to pyrethroids, but are still susceptible to bendiocarb. In Africa the pyrethroid resistance had highly increased in *An. gambiae* populations. This increase coincided with the period where chemical vector control was deployed with unprecedented levels of coverage in Africa. In this context there was selection of resistant individuals in the treated areas (LLINs and IRS), however, in untreated or control areas, the selection of resistance recorded may have been caused by unknown factors other than LLINs and IRS. These findings have important implications for malaria vector control programs using IRS and LLIN. Firstly, assessment and monitoring of resistance to pyrethroids and bendiocarb in malaria vector control should

be a priority to help correct the current malaria preventive activities and guide in the selection of insecticides to use in the future for malaria vector control in Benin. Secondly, strategies for resistance management [49,50] should be implemented to delay the development or expansion of insecticide resistance by the rotation or the mixture of different classes of insecticides with different target sites. Thirdly, it is necessary to implement a dialogue and partnerships between the fields of health and agriculture in order to coordinate the appropriate use of insecticides with reciprocal benefits for both parties.

Acknowledgements

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative), which financially supported this study through USAID and RTI. The authors would like to thank Adango Arnaud, Houndeton Geraldo, Koudenoukpo Sébastien, Azondekon Roseric for their technical assistance apopulations of Adjohoun, Dangbo, Seme, and Misserete for their collaboration.

Author details

¹Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin. ²Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin.

Authors' contributions

GGP, MS, RO and MA designed the study. GGP, NA and OO carried out the experiments. GGP and FO analyzed the data. GGP and MS drafted the manuscript. MA, GG and MS critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 12 February 2012 Accepted: 10 April 2012

Published: 10 April 2012

References

1. Akogbeto M, Chippaux JP, Coluzzi M: Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin). Revue Epidemiologie et Santé Publique. *Rev Epidemiol Santé Publique* 1992, **40**:233-239.
2. 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.
3. Curtis CF, Myamba J, Wilkes TJ: Comparison of different insecticides and fabrics for antimosquito bednets and curtains. *Med Vet Entomol* 1996, **10**:1-11.
4. Kleinschmidt I, Schwabe C, Shiva M, Segura JL, Sima V, Mabunda SJA, Coleman M: Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *AmJTrop Med Hyg* 2009, **81**(3):519-524.
5. Roll Back Malaria Partnership: Consensus Statement on Insecticide-Treated Netting and Indoor Residual Spraying Geneva, World Health Organization; 2004 [http://rbm.who.int/partnership/wg_wg_LLIN/docs/RBMWINStatementVector.pdf].
6. Hemingway J, Ranson H: Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 2000, **45**:371-391.
7. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
8. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH: Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 2000, **9**:491-497.
9. Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P: Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 1999, **15**:53-59.
10. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabiré KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Chandre F: The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health* 2004, **9**:1267-1273.
11. Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C, Nwane P, Chouaïbou M, Ndjemaï H, Simard F: First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *AmJTrop Med Hyg* 2006, **74**(5):795-797.
12. Tripet F, Wright J, Cornel A, Fofana A, McAbee R, Meneses C, Reimer L, Slotman M, Thiemann T, Dolo G, Traoré S, Lanzaro G: Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *AmJTrop Med Hyg* 2007, **76**:81-87.
13. Chouaïbou M, Etang J, Brevault T, Nwane P, Hinzoumbe CK, Mimpfoundi R, Simard F: Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop Med Int Health* 2008, **13**:476-486.
14. Kristan M, Fleischmann H, Della Torre A, Stich A, Curtis Curtis CF: Pyrethroid resistance/susceptibility and differential urban/rural distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana. *Med Vet Entomol* 2003, **17**:326-332.
15. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, Della Torre A: Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J* 2008, **7**:74.
16. Tia E, Akogbeto M, Koffi A, Toure M, Adjia AM, Moussa K, Yao T, Carnevale P, Chandre F: Pyrethroid and DDT resistance of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) in five agricultural ecosystems from Côte-d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* 2006, **99**:278-282.
17. Reimer LJ, Tripet F, Slotman M, Spielman A, Fondjo E, Lanzaro GC: An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Mol Biol* 2005, **14**:683-688.
18. Akogbeto M, Yakoubo S: Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **92**(2):123-130.
19. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.
20. Akogbeto MC, Padonou GG, Gbenou D, Irish S, Yadouleton A: Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J* 2010, **9**:204.
21. Padonou GG, Sezorlin M, Gbedjissi GL, Ayi I, Azondekon R, Djenontin A, Bio-Bangana S, Ousou O, Yadouleton A, Boakye D, Akogbeto M: Biology of *Anopheles gambiae* and insecticide resistance: Entomological study for a large scale of indoor residual spraying in South East Benin. *J Parasitol Vector Biol* 2011, **3**(4):59-68.
22. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Mount DL, Roberts JM, Mwangi RW: Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Med Vet Entomol* 1996, **10**:71-79.
23. Kulkarni MA, Malima R, Mosha FW, Msangi S, Mrema E: Efficacy of pyrethroid-treated nets against malaria vectors and nuisance-biting mosquitoes in Tanzania in areas with long-term insecticide-treated net use. *Trop Med Int Health* 2007, **12**:1061-1073.
24. Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ: Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *AmJTrop Med Hyg* 2004, **70**:591-596.
25. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB: Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J* 2008, **7**:189.
26. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F: Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J* 2004, **3**:22.

27. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM: Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 2005, 4:25.
28. Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL: Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with Bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg* 2011, 85(4):586-593.
29. Gillies MT, De Meillon B: *The Anophelinae of Africa south of the Sahara*. Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg; 1968, 54.
30. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH: Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 49:520-529.
31. Favia G, Della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti , Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 1997, 6:377-383.
32. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M: The unique mutation in Ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 2004, 13:1-7.
33. World Health Organisation: Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Document WHO/CDS/CPC/MAL/98.12 Geneva, Switzerland 1998 [http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CDS_CPC_MAL_98.12.pdf].
34. R Development Core Team: R A language and environment for statistical computing. 2.11.1. ed. Vienna Austria 2010.
35. Raymond M, Rousset F: GENEPOL (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 1995, 86:248-249.
36. Berzosa PJ, Cano J, Roche J, Rubia JM, Garcia L, Moyano E, Guerra A, Mateos JC, Petracá V, Do Rosaria V, Benito A: Malaria vectors in Bioko island (Equatorial Guinea): PCR determination of the members of *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae) and pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in *An. gambiae* sensu stricto. *J Vector Ecology* 2002, 27:102-106.
37. Sharp BL, Ridl FC, Govender D, Kuklinski J, Kleinschmidt I: Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko. *Equatorial Guinea Malar J* 2007, 6:52.
38. Djègbé I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, Akogbétó M, Corbel V: Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J* 2011, 10:261.
39. N'Guessan R, Corbel V, Akogbétó M, Rowland M: Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:199-206.
40. Balkew M, Ibrahim M, Koekemoer LL, Brooke BD, Engers H, Aseffa A, Gebre-Michael T, Elhassen I: Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from villages in central, northern and south west Ethiopia and detection of *kdr* mutation. *Parasit Vectors* 2010, 3(1):40.
41. Lines JD: Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes, a look at the evidence. *Parasitol Today* 1988, 4:17-20.
42. Protopopoff N, Verhaeghen K, Van Bortel W, Roelants P, Marcotty T, Baza D, D'Alessandro U, Coosemans M: A high increase in *kdr* in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands. *Trop Med Int Health* 2008, 13:1479-1487.
43. Yewhalaw D, Wassie F, Steurbaut W, Spanoghe P, Van Bortel W, Denis L, Tessema DA, Getachew Y, Coosemans M, Duchateau , Speybroeck N: Multiple insecticide resistance: an impediment to insecticide-based malaria vector control program. *PLoS One* 2011, 6(1):16066.
44. Djogbenou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F: Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol* 2009, 69:160-164.
45. Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C: Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 2001, 112:287-296.
46. Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M: Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* 2007, 24(4):1056-1067.
47. Djogbenou L, Noel V, Agnew P: Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J* 2010, 9:12.
48. Yadouleton WA, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard Kindé D, Akogbeto CM: Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J* 2010, 9:83.
49. Ngufo C, N'guessan R, Boko P, Odjo A, Vigninou E, Asidi A, Akogbeto M, Rowland M: Combining indoor residual spraying with chlорfenapyr and long-lasting insecticidal bed nets for improved control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*: an experimental hut trial in Benin. *Malar J* 2011, 10:343.
50. Corbel V, Henry MC: Prevention and control of malaria and sleeping sickness in Africa: where are we and where are we going? *Parasit Vectors* 2011, 4:37.

doi:10.1186/1756-3305-5-72

Cite this article as: Padonou et al.: Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasites & Vectors* 2012 5:72.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Annexe 2 : Protocoles

Les impressions des captureurs-dormeurs sur les effets des cases traitées à base d'insecticide

(Entretien individuel)

Numéro de case :

Profession :

Age :

1- Avantages ressentis

- Avez-vous bien dormi?
- Le produit insecticide a-t-il été efficace contre les moustiques ?

2- Effets secondaires.

- Avez-vous éternué ?
- Avez-vous eu mal à la tête ?
- Vos yeux ont-ils coulé de larmes ?
- Ressentez-vous des brûlures aux yeux ?
- Avez-vous été incommodé par une odeur désagréable ?

3- Souhaitez-vous poursuivre l'expérimentation ?

4- Quels sont vos souhaits pour l'amélioration de l'organisation ?

QUESTIONNAIRE

Enquêteur : Date :

...

1- Identification

11-Commune : 12-Arrondissement : 13-
Quartier :
14-Nom et prénom du répondant : 15-Age :
16-Statut dans le ménage : 17-Niveau d'instruction :
18-Groupe ethnique : 19-Religion :
20-Occupation : 201-Sexe : Masculin Féminin

2-Les nuisances du moustique

21- Quelle gêne redoutez-vous de la part des moustiques ?

- Bruit Piqûres Insomnie Paludisme

3-Prise en charge du paludisme

31-Selon-vous, quels sont les symptômes du paludisme ?

- Corps chaud maux de tête diarrhée courbature
 fatigue vertige amaigrissement maux de ventre
 autre :(à préciser)

32-Selon-vous, le paludisme est-elle une maladie ?

- bénigne grave très grave mortelle
 autre :(à préciser)

33-Lorsque quelqu'un est malade du paludisme chez-vous, le traitement se fait avec :

- les médicaments « du blanc » les médicaments « du noir »

4-Moyens de protection contre les moustiques

41- Quels sont les moyens de protection contre les moustiques que vous connaissez ?

- Fumée Poudre (épandage) Pommade répulsive
 Couverture du corps Plantes locales
 Bombes insecticides Serpentins fumigènes
 Grillages aux fenêtres Plaquettes électriques
 Moustiquaires ordinaires Moustiquaires imprégnées
 Autres :(à préciser)

5-Couverture du ménage en moustiquaire

51-Avez-vous des moustiquaires dans votre maison ?

- Oui Non

52-Combien de personnes y- a-t-il dans votre ménage ? I____I Nombre total de personnes

53-Combien de moustiquaires y-a-t-il dans votre ménage? I____I Nombre de moustiquaires

6-Connaissances des moustiquaires

61-Dormez-vous sous moustiquaire ?

Oui Non

62-Si Oui. Est-ce que je peux voir la (les) moustiquaire (s) ? Oui Non

Nombre ordinaire Nombre Imprégnée

63- Comment avez-vous obtenu la (les) moustiquaire (s)?

Don Achat Autre :

65- Si achat comment trouvez-vous le coût ?

Très cher Abordable Pas cher :

66-Quels sont les avantages possibles de l'utilisation de la moustiquaire ?

- Réduction des nuisances dues aux moustiques
- Réduction des nuisances dues aux autres insectes
- Réduction des maladies Réduction du paludisme
- Protection de l'intimité
- Autre :

67-Quels sont les inconvénients possibles de l'utilisation de la moustiquaire ?

- Sensation de chaleur Sensation d'étouffement
- Encombrante
- Autre :

7-Connaissance de la pulvérisation intradomiciliaire

71-Avez-vous déjà entendu parlé des campagnes de pulvérisations?

Oui Non NSP

72-Pensez-vous qu'il y a des avantages liés aux campagnes de pulvérisations ?

- Réduction des nuisances dues aux moustiques
- Réduction des nuisances dues aux autres insectes
- Réduction des maladies Réduction du paludisme
- Autre :

73-Pensez-vous qu'il y a des inconvénients liés aux campagnes de pulvérisations ?

- Toxicité mauvaise odeur
- Autre :

74-Accepteriez-vous une pulvérisation à l'intérieur de votre case ?

Oui Non NSP

Si Oui/Non pourquoi ? :

8- Caractéristiques des lieux d'habitation

Gîte potentiel de moustiques : proximal éloigné trop éloigné

Emplacement de la case : Isolé En concession

Nature du « mûr »: Ciment Banco Métal Bambou Bois

Nature du toit : Béton Tuile Tôle Pailles

Nature du plafond : Absence Ciment contre-plaqué Bambou Autre : (à préciser)

Trou au plafond : absent peu (2) assez (3 à 5) nombreux (> 5)

Espace entre le « mûr » et le toit : absent peu (2) assez (3 à 5) nombreux (> 5)

Fentes dans le « mûr » : absent peu (2) assez (3 à 5) nombreux (> 5)

Surface du mur : lisse rugueux

ENQUETE SUR LES SUPPORTS IMPREGNES DANS LE DEPARTEMENT DE
L'OEUME
(FOCUS GROUP)

Equipe de terrain :

Date de l'enquête :

Département :

Commune :

Arrondissement :

Quartier :

Nombre de participants :

Numéro de groupe :

1. Mesures de protection contre les piqûres de moustiques.

- Que faites-vous pour vous protéger contre les piqûres de moustiques ?
- Utilisez-vous des bombes insecticides ? Si Oui, sont-elles efficaces ?
- Que pensez-vous de la durée d'efficacité d'une pulvérisation à l'aide d'une bombe insecticide ?

2. Connaissance des moustiquaires imprégnées

- Connaissez-vous les moustiquaires imprégnées ?
- Sont-elles efficaces ?
- Comment procède-t-on pour imprégner une moustiquaire ?
- Quel rôle joue le produit qui a servi à l'imprégnation ?
- Les moustiquaires imprégnées tuent-elles seulement les moustiques ?
- Quels autres insectes tuent-elles ?
- Quel support pensez-vous qu'on peut encore imprégner ?

3. Connaissances sur les campagnes de pulvérisations.

- Avez-vous déjà entendu parler des campagnes de pulvérisations?
- Historique des campagnes de pulvérisations dans votre localité ?
- Pensez-vous qu'il y a des avantages liés aux campagnes de pulvérisations?
- Pensez-vous qu'il y a des inconvénients liés aux campagnes de pulvérisations?
- Accepteriez-vous que votre localité bénéficie des campagnes de pulvérisations?

Extraction d'ADN au CTAB, sur moustique entier

Myriam et Cécile, avril 2003

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

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

CTAB 2%

Réactifs	Volume	Conc. finale
1 M Tris HCl pH 8.0	100 ml	100 mM
0.5 M EDTA	20 ml	10 mM
NaCl	81.8 g	1.4 M
CTAB*	20 g	2 %
ddH ₂ O	QSP 1 L	

* Cetyl trimethyl ammonium bromide

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à TA.

PCR diagnostique *An. gambiae* s.l.

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Elle distingue en Afrique de l'Ouest: *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*

Réf: Scott JA, Brogdon W & Collins FH. Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993, 49(4):520-9.

Amorces

UN GTGTGCCGCTTCCTCGATGT
 AG CTGGTTGGTCGGCACGTTT
 AA AAGTGTCCCTCTCCATCCTA
 AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

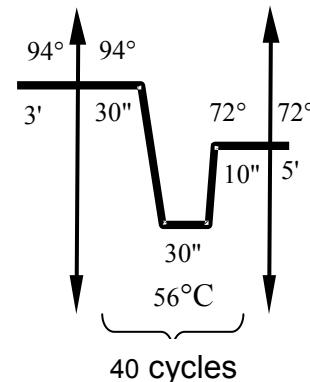
Conditions PCR

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
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

3' [30'', 30'', 10'']_{40c} 5' @ 56 °C



Taille attendue

An. gambiae : 390 bp
 An. arabiensis : 315 bp
 An. melas : 464 bp

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

ISA, janv 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 Tag 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 :

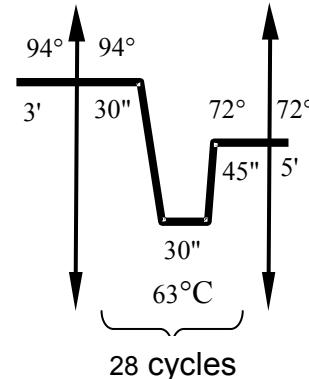
3' [30'', 30'', 45'']_{28c} 5' @ 63°C

Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



Mutation Kdr

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans un gène codant pour un canal à Na, associé à la résistance au DDT et aux pyréthrinoides.

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

Réf : Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol. 1998, 7(2):179-84.

Amorces

D1 ATAGATTCCCCGACCATG
 D2 AGACAAGGATGATGAACC
 D3 AATTTGCATTACTTACGACA
 D4 CTGTAGTGATAGGAAATTAA

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
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer D1 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D2 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D3 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Primer D4 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		14.75 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

3' [30'', 30'', 10'']_{35c} 5' @ 55°C

Taille attendue

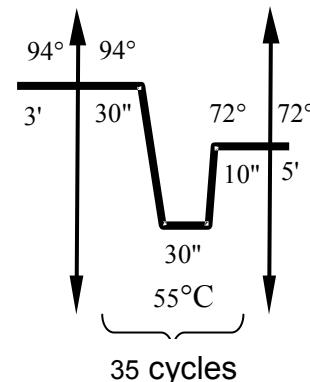
D1/D2 : 293 bp

D1/D3 : 195 bp

D2/D4 : 137 bp

Résistant

Sensible



Mutation Ace 1 chez *Anopheles*

Isa et Alphonsine, juin 2003

Polymorphisme dans le gène ace-1 qui code pour l'acéthylcholine estérase Ache1.

La mutation se situe au niveau de l'AA 119, qui est une Gly chez les susceptibles et une Ser chez les résistants.

Réf : Weill, M. et al. (2003) Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423 (6936), 136-137

Amorces

Ex3AGdir	GATCGTGGACACCGTGTTCG
Ex3AGrev	AGGATGGCCCGCTGGAACAG

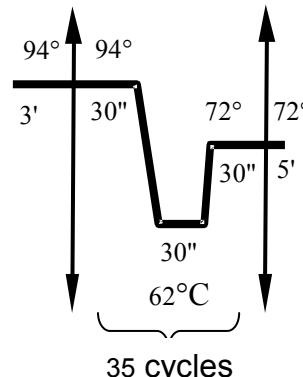
Conditions PCR

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
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer Ex3AGdir (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Primer Ex3AGrev (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

3' [30'', 30'', 30'']_{35c} 5' @ 62°C



Taille attendue

Ex3AG : 541 bp

Vérifier 5µl de produit de PCR sur gel d'agarose 1.5%

Digestion enzymatique

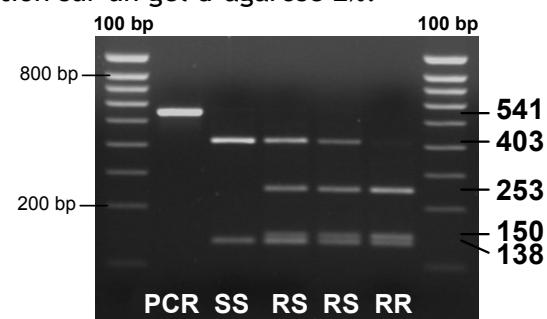
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH ₂ O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

Incuber à 37°C pendant 3 heures, voire toute la nuit.

Vérifier la réaction en faisant migrer 10µl de la digestion sur un gel d'agarose 2%.

Tailles attendues

Génotype	SS	RR
taille	403 bp	253 bp
	150 bp	138 bp
	138 bp	138 bp



ELISA - CSP
(Circumsporozoite protein de Plasmodium)

DF, janv 2003

D'après Wirtz, Burkot et al . technique Fontenille LIN Mpl 2002

- 01 - SI NECESSAIRE PREPARER LES TAMPONS PBS - BB - TWEEN 20 - NP 40 +BB
- 02 - PREPARER LES MOUSTIQUES (Tête - Thorax dans tube numéroté)
* Ajouter 20 µl de NP 40/BB Laisser au moins 1 H (ou la nuit au réfrigérateur)
- 03 - PREPARER LE PLAN DE LA PLAQUE SUR LA FEUILLE (N° des moustiques, date, ...)
- 04 - **BROYER** LES MOUSTIQUES : 2 fois 190 µl de BB (conservation des tubes à - 20°C)
- 05 - SI NECESSAIRE RECONSTITUER LES ACm de capture (cf. fiche), garder à -20°C
- 06 - SENSIBILISER LES PLAQUES ELISA
 - a) Préparer les solution d'ACm de capture aux dilutions voulue : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande
 - b) - vortexer

CAPTURE Pour 1 plaque		Pour 3 plaques	
<i>p. falciparum</i> :	15 µl/5 ml PBS	f :	45 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax</i> 210 :	5 µl/5 ml PBS	v 210:	15 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax</i> 247 :	10 µl/5 ml PBS	v 247 :	30 µl/15 ml PBS
<i>p. malariae</i>	60 µl/5 ml PBS	m :	180 µl/15 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml PBS	o :	45 µl/15 ml PBS

- b) Mettre 50 µl/puits (à pipette 8 canaux, pte jaune) de chaque ACm de capture

* SCREEN : mélange des plasmodiums a tester (n x 50 µl)
* monospécifique : uniquement du plasmodium étudié (1 x 50 µl)
Laisser la nuit sur la paillasse (ou le W.E. à 4°C).

- 07 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 08 - METTRE 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique) pendant 1 H sur paillasse.
Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tête Thorax dans BB)
- 09 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 10 - METTRE 50 µl du broyat de moustique par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit.
Laisser pendant 2 H sur paillasse.
- 11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les ACm CONJUGUES, si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)
- 12 - VIDER LA PLAQUE. LAVER 2 FOIS AU PBS/TWEEN 20



13 - METTRE 50 µl/puits de l'ACm CONJUGUE, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl) LAISSER 1 H sur paillasse

ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande

CONJUGUES Pour 1 plaque

<i>p. falciparum</i> :	7,5 µl/5 ml BB
<i>p. vivax</i> 210:	10 µl/5 ml BB
<i>p. vivax</i> 247 :	2 µl/5 ml BB
<i>p. malariae</i>	15 µl/5 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml BB

Pour 3 plaques

f :	22,5 µl/15 ml BB
v 210	30 µl/15 ml BB
v 247 :	6 µl/15 ml BB
m :	45 µl/15 ml PBS
o :	45 µl/15 ml BB

14 - Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le SUBSTRAT de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

- * 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- * 30 ml de Tampon citrate
- * 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

15 - VIDER LA PLAQUE. LAVER 4 FOIS AU PBS/TWEEN 20

16 - METTRE 100 µl/puits de **SUBSTRAT**

17 - INCUBER 30 minutes A OBSCURITE SANS TOUCHER (coloration bleue 620 nm)

18 - Blocage par 50 µl d'**acide sulfurique 4N** : Coloration jaune :

19-Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa

Réactifs et quantités pour ELISA - CSP

DF, janvier 2003

* PBS

Reconstituer le PBS en poudre Sigma :
9,7 g dans 1 L d'eau distillée (ex réf. Sigma D 5773)

* **NP 40/BB** = Nonidet P40 (Sigma n° 3516, 50 ml) pour une plaque 2 ml = 25 µl NP 40 + 2 ml BB, agiter (préparer pour 5 plaques 10 ml + 125 µl NP 40)

* **BB** = Dans un litre PBS, ajouter :

- 1) 5 g de Casein (Sigma C 5890)
- 2) 0,1 g de Thiomérosal (Sigma T 5125)
- 3) 0,04 g de Phenol red (Sigma P 4758)
- 4) 10 g de BSA (Sigma A 7906)

AGITER 2H

(pour les calculs une plaque , moustiques à broyer compris : 100 ml de BB)

* **PBS/TWEEN 20** - 500 µl de Tween 20 dans 1l de PBS, agiter (Sigma P 1379)

Substrat de Peroxydase = Pour 3 plaques :

- * 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- * 30 ml de Tampon citrate
- * 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

Tampon Citrate pH4

- préparer le Tampon Citrate pH4 : Pour 1 litre :

Acide citrique, 1 H ₂ O	11,77 g
Hydroxyde de Sodium	4,48 g

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

RECONSTITUTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX LYOPHILISES (ACm)

* milieu reconstitution = 1/2 volume H₂O + 1/2 volume Glycérol (Sigma G.9012)

- 1,0 mg ACm + 2 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)
- 0,5 mg ACm + 1 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)
- 0,25 mg ACm + 0,5 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

QUANTITE D'ACM NECESSAIRE :

- Sensibilisation : ACM capture dans du PBS

DILUTIONS RECOMMANDÉES PAR WIRTZ :

P. falciparum capture = 0.10µg / 50µl PBS (soit 10 µg par plaque : soit 20 µl par plaque dans 5 ml PBS)
P. vivax-210 capture = 0.025µg / 50µl PBS (soit 2,5 µg par plaque : soit 5 µl par plaque dans 5 ml PBS)
P. vivax-247 capture = 0.05µg / 50µl PBS (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml PBS)

CAPTURE Pour 1 plaque

<i>p. falciparum</i> :	15 µl/5 ml PBS
<i>p. vivax 210</i> :	5 µl/5 ml PBS
<i>p. vivax 247</i> :	10 µl/5 ml PBS
<i>p. malariae</i>	60 µl/5 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml PBS

Pour 3 plaques

f :	45 µl/15 ml PBS
v 210:	15 µl/15 ml PBS
v 247 :	30 µl/15 ml PBS
m :	180 µl/15 ml PBS
o :	45 µl/15 ml PBS

- Révélation : ACM conjugués à Peroxydase dans BB

DILUTIONS RECOMMANDÉES PAR WIRTZ :

P. falciparum peroxydase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB)
P. vivax -210 peroxydase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB)
P. vivax -247 peroxydase = 0.01µg / 50µl BB (soit 1 µg par plaque : soit 2 µl par plaque dans 5 ml BB)

CONJUGUES Pour 1 plaque

<i>p. falciparum</i> :	7,5 µl/5 ml BB
<i>p. vivax 210</i> :	10 µl/5 ml BB
<i>p. vivax 247</i> :	2 µl/5 ml BB
<i>p. malariae</i>	15 µl/5 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml BB

Pour 3 plaques

f :	22,5 µl/15 ml BB
v 210	30 µl/15 ml BB
v 247 :	6 µl/15 ml BB
m :	45 µl/15 ml PBS
o :	45 µl/15 ml BB

Les ACM sont fournis par le Dr WIRTZ, CDC Atlanta

TEMOINS

Dilutions pour les témoins positifs CSP antigen de P. f, P. v 210 et P. v 247

Attention reconstitution du lyophilisat dans eau distillée, puis dilution dans BB

Ces témoins sont fournis par le CDC

Espèce plasmodiale	Numéro de la Solution	Volume de l'antigène contrôle positif	Volume de Blocking Buffer (BB)	Concentration en antigène dans 50 µl
<i>P. falciparum</i>	Stock	Pf lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist.	----
	I	5µl de stock	500µl BB	500ng
	II	10µl de I	1000µl BB	5000pg
	* III	20µl de II	1000µl BB	100pg
	Témoin pos			
<i>P. vivax 210</i>	Stock	Pv210 lyophilisé (25 µg)	25 µl d'eau dist	----
	A	5µl de stock	500µl BB	500ng
	B	10µl de A	1000µl BB	5000pg
	C	20µl de B	500µl BB	200pg
	* D	200µl de C	800µl BB	40pg
<i>P. vivax 247</i>	Stock	Pv247 lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist	----
	1	5µl de stock	500µl BB	500ng
	2	40µl de 1	1000µl BB	20ng
	3	100µl de 2	700µl BB	2.5ng
	Témoin pos			

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

Summary

Anopheles gambiae, the main vector of malaria in Africa, is characterized by high resistance to pyrethroids in Benin. It is in this context that the National Malaria Control Program (NMCP) decided in 2007 to implement a strategy of malaria vector control based on Indoor Residual Spraying (IRS) through the support of "President's Malaria Initiative" of American government. This thesis has been elaborated as part of the implementation of the first experiment in Benin IRS. It aims to select a non-pyrethroid insecticide as treatment for homes, to provide baseline sociological and entomological data to assess the impact of the intervention on malaria transmission and the dynamic of *Anopheles gambiae* resistance in the area under insecticide treatment.

The study was carried out in the districts of Adjohoun, Dangbo, Missérété and Seme-Kpodji. In the swampy zone, IRS was not implemented, therefore long lasting insecticide-impregnated net (LLIN) (Permanet2.0) were distributed. Porto-Novo who did not receive intervention, was considered as control district. The choice of alternative insecticide was carried out by the evaluation of the effectiveness in experimental huts of five insecticides. Moreover, the existing limits of the IRS were identified through a survey based on knowledge, attitudes and practices (KAP) of the populations in the four districts. Before the implementation of IRS, mosquito collections, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) and WHO susceptibility tests coupled to *kdr* and *ace-1^R* search were performed.

The findings showed that IRS was accepted by 98.7% of respondents. The bendiocarb was revealed as the alternative product to use for the treatment of houses. The study has shown a drastic decrease in the *An. gambiae* infected bites in the sprayed areas. A significant decrease of infected bites was also observed after mass distribution of LLINs. Monitoring of *An. gambiae* resistance to insecticides showed that the level of resistance to permethrin and DDT has not changed. *An. gambiae* also remained susceptible to bendiocarb throughout the period. However, resistance to deltamethrin was noticed in all localities including the control area.

The indoor residual spraying strategy implemented, was successful. This is justified by the scale of the campaign, the strong community participation noted during the campaign, the behavior of the vector endophilic, the high susceptibility of the vector to bendiocarb, the lethal effect of this product on resistant mosquitoes and decreased longevity of *An. gambiae*. Despite the effectiveness of IRS, this method has its weaknesses. The low residual activity of bendiocarb on treated surfaces, the exophagic behavior of *An. gambiae* after IRS and the full coverage of LLINs, the sociological disadvantages of using MIILDs requires the need for complementarity between control tools.

Keywords: malaria, *Anopheles gambiae*, bendiocarb, IRS, long lasting insecticide-impregnated net, deltamethrin.

Résumé

Anopheles gambiae, le principal vecteur du paludisme en Afrique, est caractérisé par une forte résistance aux pyréthrinoïdes au Bénin. C'est dans ce contexte que le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a décidé, en 2007, de mettre en œuvre une stratégie de lutte anti-vectorielle basée sur la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide (PID) grâce à l'appui de « President's Malaria Initiative » du gouvernement Américain. La présente thèse a pour but de sélectionner un non-pyréthrinoïde alternatif pour le traitement des maisons, de fournir des données de base sociologiques et entomologiques en prélude à la mise en œuvre de la PID, de mesurer l'impact de cette intervention sur la transmission du paludisme et l'évolution de la résistance dans la zone sous traitement insecticide.

L'étude a été réalisée dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè-Kpodji. Mais dans les secteurs non éligibles pour la PID, des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) de type Permanet 2.0 ont été mises à la disposition de la population. La commune de Porto-Novo n'ayant pas bénéficié d'intervention a servi de localité témoin. Pour la sélection de l'insecticide alternatif, une évaluation en cases expérimentales a porté sur l'efficacité de 5 insecticides. Par ailleurs, une enquête portant sur les connaissances, les attitudes, les pratiques (CAP) et l'adhésion des populations des quatre communes en matière de la PID a été réalisée. Durant les périodes avant et après la mise en œuvre de la PID, des captures de moustiques, la détermination de l'indice sporozoïtique par la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), la recherche du gène de résistance (*kdr* et/ou *ace-1^R*) et la réalisation des tests de sensibilité aux insecticides, ont été organisées.

Les résultats ont révélé que le taux d'acceptabilité de la stratégie PID par les communautés a été de 98,7% et le bendiocarb est le produit alternatif à utiliser pour le traitement des maisons. Lors de la campagne, une baisse drastique du taux d'inoculation entomologique (TIE) a été enregistrée. Le niveau de résistance vis-à-vis de la perméthrine et du DDT n'a pas évolué. De plus *An. gambiae* est demeuré sensible au bendiocarb. En revanche cette espèce est devenue résistante à la deltaméthrine.

La stratégie d'utilisation du bendiocarb en PID contre *An. gambiae* résistant aux pyréthrinoïdes a été prometteuse. Ce succès s'explique par la forte participation communautaire, la grande étendue de l'opération, le comportement endophile de *An. gambiae*, sa forte sensibilité au bendiocarb et la diminution de sa longévité. Par contre la faible rémanence du bendiocarb, le comportement exophage de *An. gambiae* après intervention et les handicaps sociologiques de l'utilisation des MIILDs soulignent la nécessité d'une complémentarité entre les outils de lutte antivectorielle.

Mots clés : paludisme, *Anopheles gambiae*, bendiocarb, pulvérisation intradomiciliaire. moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action, deltaméthrine.