



REPUBLICUE 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'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

Numéro d'enregistrement : 68/EDSV

Année académique : 2013-2014

Evaluation des aspects épidémiologiques du paludisme en zones de forte et de faible résistances des vecteurs aux insecticides dans le département du Plateau au Bénin

Présentée par : **Filémon Tatchémè TOKPONNON**
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

OPTION : ENTOMOLOGIE MEDICALE ET VETERINAIRE

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Président : Achille MASSOUGBODJI, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

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

Co-Directeur de Thèse : Dorothée Akoko KINDE GAZARD, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Rapporteurs : **Sékou F. TRAORE**, Professeur Titulaire, Université de Bamako, Mali

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

Kabirou MOUTAÏROU, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Examinateurs : **Sahidou SALIFOU**, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Nestor SAKITI, Maître de Conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Date de soutenance : 27 Décembre 2014 **Mention : Très honorable avec les félicitations du jury**

Remerciements

Mes pensées de grâitudes et de reconnaissances vont en l'honneur de Dieu et de la sainte famille Jésus- Marie-Joseph qui m'ont aimé et conduit toute ma vie et durant toute la période de réalisation de ce travail.

Les travaux présentés dans ce document ont été menés dans plusieurs institutions de recherche. Les aspects entomologiques et immunologiques ont été réalisés au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sous la direction du Professeur Martin AKOGBETO que je remercie sincèrement pour m'avoir offert des conditions de travail idéales, avec ses institutions partenaires telles que l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et la London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM). Les Aspects épidémiologiques ont été réalisés à l'Unité de Recherche de Parasitologie – Mycologie de la Faculté des Sciences de la Santé (FSS) de l'Université d'Abomey –Calavi dirigé par le Professeur Achille MASSOUGBODJI à qui je dis toutes mes grâitudes et enfin au Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) dirigé par le Docteur Mariam OKE SOPOH que je remercie sincèrement.

Ils ont été soutenus financièrement par la Fondation Bill & Melinda Gates que je remercie avec déférence. Merci à l'Organisation Mondiale de la Santé et au bureau pays qui assure la coordination de ce financement.

Ce travail a été réalisé grâce au dévouement de nombreuses personnes, soit par une collaboration scientifique active soit par l'aide matérielle ou morale qu'elles nous ont apporté. Mes pensées durant la rédaction de ce document sont destinées aux précieuses personnes, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour :

- Son Excellence Madame le Ministre de la Santé, Dorothée Akoko KINDE-GAZARD, Professeur titulaire à la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi, mon co-directeur de thèse, depuis la soutenance de mon mémoire de Master en Entomologie Appliquée que vous aviez présidé, vous avez toujours su me soutenir, m'accompagner, m'encourager et répondre à mes multiples sollicitations, même dépassant le cadre professionnel, tout au long de ces 4 années de thèse malgré vos multiples occupations et vos grandes et hautes responsabilités au sommet du département de la santé de notre pays. La rigueur dans le travail, la riche culture scientifique et les nombreuses expériences partagées m'ont exacerbé, motivé et m'ont permis de réaliser ce travail en toute sérénité, dans des conditions idéales. Vous m'avez accepté à vos côtés en qualité de membre de la Société Béninoise de Parasitologie-Mycologie et dans le bureau de l'Association Béninoise de Lutte

contre les Moustiques; toutes, deux institutions que vous présidez. Il vous a plu de me confier la responsabilité du Service de la Lutte Anti-Vectorielle Intégrée (SLAVI) au sein du Programme National de Lutte contre le Paludisme. Je suis très heureux de pouvoir vous exprimer toute ma reconnaissance !!!

- Monsieur Martin AKOGBETO, Professeur titulaire au Département de Zoologie de l'Université d'Abomey-Calavi, Directeur du CREC, Directeur de ma thèse, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, Très cher Maître, vous m'aviez déjà enseigné l'entomologie à l'EPAC (ex- CPU) au cours de ma formation pour le Diplôme d'Ingénieur des Travaux (DIT) en Analyses Biomédicales. Je tiens à vous manifester tout mon bonheur d'avoir pu bénéficier, durant ces dernières années de Master en Entomologie Appliquée et de thèse, de votre rigueur et de votre humilité scientifiques qui ont été déterminantes pour la réalisation de ce travail. Je n'oublierai jamais les principes théoriques et pratiques souvent nombreuses sur les maladies à transmission vectorielle en générale et sur le paludisme en particulier. Vous m'avez formé, soutenu et inculqué les notions qui m'ont permis d'évoluer. Merci de m'avoir fait aimer l'entomologie, d'apprécier la beauté des vecteurs. Votre simplicité, votre jovialité, votre amour du travail bien fait, votre excellente qualité de dirigeant constitue pour moi un exemple. Daigné recevoir toute ma gratitude.

- Aux membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

- Monsieur Achille MASSOUGBODJI, Professeur titulaire à la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi, Responsable de l'Unité de Recherche en Parasitologie-Mycologie de la Faculté des Sciences de la Santé, veuillez recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepter présider le jury qui évalue cette thèse.

- Professeur Ousmane FAYE, malgré vos nombreuses occupations, vous avez accepté d'être rapporteur de ma thèse, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

- Professeur Sékou F. TRAORE, sincère merci à vous pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

- Professeur Kabirou MOUTAÏROU, sincère merci à vous pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Professeur Salifou SAHIDOU, recevez ici mes sincères remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury.

- Professeur Nestor SAKITI, vous m'aviez enseigné la parasitologie en Master d'Entomologie Appliquée. Vous êtes pour moi, un modèle à suivre. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

- Professeurs Ambaliou SANNI, Kabirou MOUTAÏROU et Akpovi AKOUEGNINOU, vous avez été les dirigeants de mon école doctorale actuelle. Sincère merci pour avoir toujours répondu à mes sollicitations administratives.
- Madame Mariam OKE SOPOH, Coordonnatrice du PNLP, vous avez accepté malgré ma position de collaborateur de service, que je poursuive mes travaux de recherche sur le Projet de Recherche dont vous avez la responsabilité administrative, veuillez recevoir ma profonde reconnaissance.
- Monsieur Yves Eric DENON, Cordonnateur Adjoint du PNLP, nous avons été ensemble pour beaucoup de défis liés au travail et à la recherche. Vous m'avez toujours soutenu dans mes actions et je tiens à vous dire toute ma reconnaissance.
- A l'équipe de recherche du Projet Bill Gâtes au Bénin en particulier Dr Aurore HOUNTO OGOUYEMI, Dr Dina GBENOU, Dr Yolande SISSINTO de Savi, Dr Alioun ADECHOUBOU, Dr Adicath ADEOTHY, Dr Abel WAKPO, Mr Patrick MAKOUTODE, Dr Raphaël N'GUESSAN, Dr Sylvie CORNELIE, Mr Arthur SOVI, Mr Achille Oumbouke, Dr Vincent CORBEL, Dr Innocent DJEGBE, Mr Gisldas YAHOUEDO, recevez toute ma reconnaissance et toute mon amitié pour votre contribution non moins louable à la réalisation de ce travail.
- A l'équipe de recherche au niveau international, Pr Immo KLEINSCHMIDT, Pr Martin DONNELLY, Abraham MNZAVA, Dr. Michael MACDONALD, Dr Tessa KNOX, pour vos importantes contributions à la réalisation de ce travail, je vous en sais gré.
- Chers collègues du PNLP, Mesdames et Messieurs DENAKPO Boniface, AHOLOUPKE Bruno, ADJIBABI Cherifatou, TOHUNGODO Dominique, ADJARO Jérémie, ADOGNON CHABI Larissa, HABIBOU Florent, ATAYI Simon, et tous les autres collègues du PNLP et des cellules départementales, je viens vous dire toute ma gratitude pour tout ce que nous avons pu faire ensemble.
- Mes amis et collaborateurs du Services LAVI, FASSINOU Hector, AKAKPO Evelyne et MISSIKPODE Désiré, nous avons fait beaucoup de choses ensemble pour amener le service à répondre à ses multiples sollicitations et vous m'avez aussi aidé dans la réalisation de ce travail, trouvez ici ma marque de reconnaissance.
- Professeurs Ambaliou SANNI, Kabirou MOUTAÏROU et Akpovi AKOUEGNINOU, respectivement Directeur, Directeur Adjoint et Secrétaire Général de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie de la FAST. Sincère merci pour avoir toujours répondu à mes sollicitations administratives.

- Madame Marie-Claire Henry, Professeur de parasitologie à l'IRD, vous m'aviez orienté sur le terrain et au laboratoire lors de mon mémoire de Master que vous aviez encadré. La possibilité de conduire des travaux de recherche à la fois en Entomologie et en Parasitologie dans une même étude, je l'ai apprise de vous. Je suis heureux de vous remercier pour tout ce que vous m'avez appris.
- Madame et Messieurs, Julien DOUANIO, Fabrice CHANDRE, Thierry Baldet, Thibaut Martin, Cédric Pennetier, Alain Nahum, Alex Asidi, Luc Djogbénou vous tous, chercheurs dont j'ai fait la connaissance au PNLP, au CREC et dans le cadre de la recherche. Veuillez recevoir ici ma gratitude pour votre collaboration.
- Monsieur OSSE Razaki, j'ai été séduit par ton soutien lors de la réalisation de ce travail et je tiens à dire toutes ma gratitude.
- Monsieur Joseph Chabi, mes premiers pas dans l'identification morphologique des moustiques sur le terrain ont été guidés par toi et tu n'as pas cessé d'être disponible pour m'orienter, lors de mon passage à l'IRD, pour tous ces moments passés ensemble, je tiens à te dire merci.
- Monsieur Armel Djènontin, Gil Germain Padonou, et Anges Yadouléton, chers aînés, j'ai reçu de précieux conseils de votre part qui m'ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Recevez à travers ce document, mes sincères remerciements.
- Mes chers amis Rock Aïkpon, Cyriaque Azondékon, Christian Agossou, Maurille Elégbédé, Augustin Koudamiloro, Odile Aïmihouè, Yoa Mario, Yarou Boni de la première promotion de Master d'Entomologie Appliquée de la FAST je voudrais vous témoigner toute mon amitié et un chaleureux merci pour rappeler la solidarité et l'ambiance conviviale de nos relations.
- Je remercie Noukpo Herbert et Dr Franck REMOUE pour la réalisation des tests immunologiques.
- Je tiens aussi à remercier mesdames et messieurs Yamadjako Médard, Clémence Durand, Renaud Govoéchan, Rodrigue Agossa, Balbine Kindji, et tous les étudiants en Master d'Entomologie Appliquée, qui sont mes amis et collaborateurs du CREC.
- Messieurs Sébastien Koudénoukpo, Géraldo Houndéton et Aboubakar Sidick, pour les manipulations PCR au laboratoire, je vous dis merci.
- Une attention particulière à Monsieur Thibaud LEGBA, pour sa contribution et sa motivation sans faille dans les analyses des données de cette thèse.
- Il nous est également très agréable d'adresser de vifs remerciements aux autorités politico-administratives et sanitaires des communes du Plateau ayant fait objet de nos travaux, aux agents enquêteurs, aux relais communautaires, aux captureurs, et toutes les populations de ces

communes dont la confiance et l'amitié ont permis de surmonter les multiples difficultés rencontrées.

- Mon cher père Léonard TOKPONNON et ma chère mère Madeleine LINDJETO, jamais je ne trouverai les mots exacts pour vous exprimer toute mon affection, et toute ma fierté. Puisse Dieu vous garder encore longtemps auprès de nous vos enfants car nous n'aurons jamais fini d'avoir besoin de vous.

- Joëlle Armande Mèdéssè ma chère épouse ainsi que Martin Béni, Yvette Gracia, Raphaëlla et Alberta mes chers enfants, j'ai entrepris tout ceci pour vous. Je sais que mes multiples déplacements et occupations dans le cadre de cette étude vous ont créé des manques énormes, les mots pour vous remercier ne suffiront pas. Vos compréhensions ont constitué pour moi la force pour réaliser ce travail. Je vous aime mes chers.

- Mes oncles et tantes, je remercie pour tout le soutien dont j'ai bénéficié de votre part.

- Mes sœurs et mes frères, je vous exprime tout mon amour que je ressens pour vous. Vous êtes et vous serez toujours mes premiers compagnons pour la vie.

- Mes cousins et cousines, vos multiples contributions m'ont permis de réaliser ce travail qui est aussi le vôtre. Daigné le recevoir comme le fruit de nos efforts.

Tous les membres de ma belle famille, sincère merci pour toutes vos contributions en particulier ma belle mère.

Mes amis, Père Francis BARKA NADO SMA, Père Augustin Placide HOUESSINON SMA et tous mes autres amis prêtres, séminaristes, frères et sœurs en Christ et particulièrement ceux du Renouveau Charismatique Catholique, je vous dis merci pour le soutien.

Mes dernières pensées durant la rédaction de ce document sont destinées aux spéciales personnes, celles dont les noms n'ont pu être cités.

Table des matières

Liste des sigles, abréviations et acronymes.....	1
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	6
Liste des annexes.....	8
Chapitre 1 : Introduction et généralités sur le paludisme.....	9
1. Introduction générale.....	10
2. Généralités sur le paludisme.....	19
2.1 Définition et bref rappel historique.....	19
2.2 Epidémiologie du paludisme.....	19
2.2.1 Importance médicale du paludisme.....	19
2.2.2 Les protagonistes.....	23
2.2.2.1 Les agents pathogènes.....	23
2.2.2.2 Cycle de développement de <i>Plasmodium</i>	24
2.2.2.2.1 Schizogonie chez l'Homme.....	25
2.2.2.2.2 Sporogonie chez le moustique femelle.....	27
2.2.3 Diagnostic de l'infection.....	27
2.2.3.1 Evaluation de la morbidité.....	27
2.2.3.2 Diagnostic biologique.....	28
2.2.3.2.1 Diagnostic biologique non spécifique.....	28
2.2.3.2.2 Diagnostic biologique spécifique.....	28
2.2.4 Pathogenèse symptomatologie du paludisme et traitement.....	33
2.2.4.1 Infection asymptomatique et immunité de prémunition.....	33
2.2.4.2 Accès simple ou de primo-invasion.....	34
2.2.4.3 Accès sévère.....	35
2.2.4.4 Traitement du paludisme, chimio-prévention et résistance aux antipaludiques.....	35
2.2.4.5 Anophèles vecteurs du paludisme et quelques éléments de leur bio-écologie.....	37
2.3 Méthodes de lutte antivectorielle.....	40
2.3.1 Lutte contre les larves.....	40
2.3.2 Lutte contre les adultes.....	41
2.3.3 Réduction du contact homme-vecteur.....	42
2.4 Résistance de <i>Anopheles gambiae</i> s.l aux insecticides.....	42

2.4.1 Mécanismes de résistance.....	43
2.4.1.1 Résistance comportementale.....	44
2.4.1.2 Résistance métabolique.....	44
2.4.1.3 Résistance physiologique.....	45
2.4.2 Impact de la résistance sur les programmes de lutte contre les vecteurs.....	47
2.4.3 Stratégies de gestion de la résistance.....	48
2.5 Méthodes d'évaluation de la lutte contre le paludisme.....	49
2.5.1 Acceptabilité et surveillance des effets secondaires.....	50
2.5.2 Evaluation entomologique de la lutte anti-vectorielle (LAV).....	50
2.5.2.1 Evaluation du risque d'exposition.....	50
2.5.2.1.1 Captures sur appât humain.....	51
2.5.2.1.2 Les pièges.....	51
2.5.2.1.3 Faune résiduelle.....	52
2.5.2.2 Evaluation du risque de transmission.....	52
2.5.2.3 L'analyse du repas sanguin.....	54
2.5.3 Evaluation de l'impact épidémiologique de la lutte.....	54
2.5.3.1 Critères cliniques.....	54
2.5.3.1.1 Indice splénique ou indice de Hackett.....	54
2.5.3.1.2 La morbidité palustre.....	55
2.5.3.1.3 La mortalité palustre.....	55
2.5.3.2 Critères parasitologiques : les infections plasmodiales.....	56
2.5.3.2.1 La prévalence des infections plasmodiales.....	56
2.5.3.2.2 La densité parasitaire	57
2.5.3.2.3 L'incidence des infections plasmodiales.....	57
2.5.3.3 Analyses des données séro-épidémiologiques.....	58
Chapitre 2 : Etude préliminaire en vue du choix de la zone d'étude.....	60
1. Méthodes	62
1.1 Description de la zone d'étude.....	62
1.1.1 Ifangni.....	62
1.1.2 Sakété.....	63
1.1.3 Pobè.....	63
1.1.4 Kétou.....	63

1.2 Collecte de larves d'anophèles et élevage de moustique.....	63
1.3 Tests de sensibilité aux insecticides.....	64
1.4 Cartographie de la résistance.....	64
1.5 Analyses statistiques des données.....	65
2. Résultats.....	65
2.1 Taux de mortalité des vecteurs à la deltaméthrine.....	65
2.2 Cartographie de la résistance des moustiques vecteurs à la deltaméthrine	68
2.3 Identification des zones R ⁺ et R ⁺⁺⁺ d' <i>An. gambiae</i> aux pyréthrinoïdes.....	68
3. Discussion.....	69
4. Conclusion.....	71

Chapitre 3 : Evaluation de la couverture, l'utilisation et l'intégrité physique des MIILD dans les deux types de zones de résistance.....

1. Matériel et méthodes.....	75
1.1 Zone d'étude.....	75
1.2 Conception de l'étude.....	77
1.3 Analyses statistiques.....	77
2. Résultats.....	78
2.1 Caractéristiques des ménages de l'étude	78
2.2 Disponibilité des MIILD.....	79
2.3 Facteurs associés à la disponibilité des MIILD.....	80
2.4 Utilisation des MIILD.....	81
3. Discussion.....	84
4. Conclusion.....	86

Chapitre 4 : Impact de l'efficacité des MIILD sur la transmission du paludisme en zone de résistance des vecteurs aux insecticides.....

1. Matériel et méthodes.....	89
1.1 Zone d'étude.....	89
1.2 Echantillonnage des populations de moustiques.....	89
1.3 Traitement des moustiques.....	90
1.4 Recherche de l'infection par la méthode ELISA.....	90
1.5 Analyse des données.....	90
2. Résultats.....	90

2.1 Variation de l'agressivité de <i>An. gambiae</i> sur homme (ma) 24 mois après la mise en place des MIILD dans les zones de faible et de forte résistances	91
2.2 Impact de l'efficacité des MIILD sur la transmission du paludisme en zone de faible et de forte résistance de <i>An. gambiae</i> aux pyréthrinoïdes.....	92
2.3 Impact des MIILD sur la longévité de <i>An. gambiae</i> dans les zones de faible et de forte résistance aux insecticides	93
3. Discussion.....	94
4. Conclusion.....	96

Chapitre 5 : Evaluation de l'efficacité protectrice des MIILD et mesure de la prévalence de *Plasmodium falciparum* et de l'anémie chez les enfants âgés de moins de 5 ans provenant des localités de faible et de forte résistances des vecteurs aux insecticides.....97

I. Evaluation de l'efficacité protectrice de la MIILD chez les enfants âgés de moins de 5 ans vus en milieu de soins provenant des différentes zones	98
I.1. Matériel et Méthodes.....	99
I.1.1 Cadre d'étude.....	99
I.1.2 Méthode d'étude.....	99
I.1.2.1 Type d'étude, échantillonnage et population d'étude.....	99
I.1.2.2 Déroulement de l'étude.....	100
I.1.2.3 Supervision des activités.....	101
I.1.2.4 Préparation de la goutte épaisse/Frottis sanguin.....	101
I.1.2.4.1 Préparation de la goutte épaisse.....	101
I.1.2.4.2 Préparation du frottis sanguin.....	101
I.1.2.4.3 Coloration des gouttes épaisses et des frottis minces.....	101
I.1.2.4.4 Séchage et lecture des lames.....	102
I.1.2.5 Système de numérotation des échantillons.....	102
I.1.2.6 Conservation des lames.....	103
I.1.2.7 Confection des confettis.....	103
I.1.2.7.1 Technique	103
I.1.2.7.2 Conservation des papiers filtres.....	104
I.1.2.8 Dosage des anticorps.....	104
I.1.2.9 Prise en charge des cas.....	104
I.1.2.10 Considérations éthiques.....	105

I.1.2.11 Gestion et analyses des données.....	105
I.2. Résultats.....	106
I.2.1 Evaluation des variables chez les cas et les témoins selon les localités de provenance des enfants.....	106
I.2.2 Facteurs associés à la présence de <i>Plasmodium falciparum</i> dans le sang de l'ensemble des enfants.....	107
I.2.3 Efficacité protectrice des MIILD utilisées par les enfants.....	109
I.2.4 Influence de la résistance sur les paramètres épidémiologies des enfants dans l'étude.	109
I.2.5 Evaluation de la réponse IgG anti-salivaire spécifique.....	110
I.2.5.1 Réponse IgG anti-salive selon le statut de faible ou de forte résistance des vecteurs et l'utilisation des MIILD par l'ensemble des enfants.....	110
I.2.5.2 Réponse IgG anti-salive selon le statut infectieux des individus et les sites d'étude..	111
I.2.5.3 Réponse IgG anti-salive selon le statut infectieux des individus et les sites d'étude .	112
I.3. Discussion.....	113
I.4. Conclusion.....	117
 II. Etude de l'impact de l'utilisation des MIILD sur la prévalence de <i>Plasmodium falciparum</i> et de l'anémie chez les enfants de moins de cinq ans dans les zones de forte et de faible résistances des vecteurs aux insecticides.....	118
II.1. Méthodes.....	119
II.1.1 Zone d'étude.....	119
II.1.2 Conception de l'étude.....	120
II.1.3 Collecte des données.....	121
II.1.3.1 Sensibilité d' <i>Anopheles gambiae</i> à la deltaméthrine	121
II.1.3.2 Caractérisation des populations de <i>An. gambiae</i> par PCR: Espèces, forme moléculaire et mutation <i>Kdr</i> Leu-phe	121
II.1.3.3 Réalisation du frottis sanguin.....	121
II.1.3.4 Examen des lames au laboratoire	121
II.1.3.5 Détermination du taux d'hémoglobine.....	122
II.1.4 Analyses statistiques.....	122
II.2. Résultats.....	123
II.2.1 Taux de mortalité, forme moléculaire et résistance knock-down de <i>An. gambiae</i> ...123	
II.2.2 Description de la population, de l'utilisation des moustiquaires, de la prévalence de l'infection et de l'anémie.....	124

II.2.3 Effet de la résistance sur l'efficacité des MIILD.....	127
II.3. Discussion.....	129
II.4. Conclusion.....	132

Chapitre 6 : Evaluation de l'efficacité des MIILD sur le paludisme en zone de résistance à travers un suivi longitudinal d'une cohorte d'enfants de moins de cinq ans	133
1. Matériel et méthodes.....	134
1.1 Cadre d'étude.....	134
1.2 Type d'étude.....	135
1.3 Population d'étude.....	135
1.3.1 Cibles primaires.....	135
1.3.2 Cibles secondaires.....	135
1.4 Matériel.....	135
1.4 Méthode et technique d'échantillonnage.....	136
1.4.1 Cibles primaires.....	136
1.4.2 Cibles secondaires.....	136
1.4.3 Critères d'inclusion des cibles primaires.....	136
1.4.4 Critères d'exclusion.....	136
1.5 Taille de l'échantillon.....	137
1.6 Techniques et outils de collecte des données.....	137
1.6.1 Techniques.....	137
1.6.2 Outils.....	139
1.7 Variables mesurées.....	139
1.7.1 La variable dépendante.....	139
1.7.2 Les variables indépendantes	139
1.8 Aspects opérationnels des variables.....	140
1.9 Sensibilité des anophèles à la deltaméthrine.....	142
1.10 Analyse des données.....	142
2. Résultats.....	143
2.1 Tests de sensibilité des anophèles à la deltaméthrine.....	143
2.2 Description de la population des enfants de moins de 5 ans.....	144
2.3 Incidences, taux d'infestation et densités parasitaires selon les niveaux de résistance des vecteurs.....	146

2.3.1 Evaluation de l'incidence cumulée du paludisme maladie suivant les niveaux de résistance des vecteurs aux insecticides	146
2.3.2 Evaluation de l'incidence d'infestation suivant les niveaux de résistance des vecteurs aux insecticides	148
2.3.3 Evaluation des taux d'infestation des enfants dans les différents types de localités... 2.3.4 Evaluation des densités parasitaires dans les différentes localités de résistance des vecteurs.....	150 151
2.4 Efficacité protectrice des MIILD et influence de la résistance.....	152
2.5 Facteurs associés à la survenue des infestations	154
3. Discussion.....	156
4. Conclusion.....	159
 Chapitre 7 : Discussion générale, conclusions et perspectives.....	 160
1. Identification des villages d'étude.....	161
2. Evaluation de la disponibilité, de l'état physique et de l'utilisation des MIILD dans les différents villages.....	161
3. Impact de la résistance des vecteurs sur la transmission du paludisme en zone de couverture universelle des MIILD.....	162
4. Impact de la résistance des vecteurs sur les indicateurs épidémiologiques du paludisme mesurés au niveau des formations sanitaires.....	163
5. Prévalence de <i>Plasmodium falciparum</i> et celle de l'anémie chez les enfants de moins de cinq ans en temps qu'indicateurs d'évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs sur l'utilisation des MIILD	164
6. Impact de la résistance sur des indicateurs épidémiologiques du paludisme mesurés à travers un suivi longitudinal d'une cohorte d'enfants de moins de 5 ans en zone de forte et de faible résistance	165
 Références bibliographiques.....	 168
Annexes	192

Liste des sigles et abréviations

MS :	Ministère de la Santé
CREC :	Centre de Recherche Entomologique de Cotonou
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement
LSHTM:	London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM)
SLAVI :	Service de Lutte Antivectorielle Intégrée
PID :	Pulvérisation Intradomiciliaire
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
RBM :	Roll Back Malaria
FSS :	Faculté des Sciences de la Santé
IgG :	Immunoglobuline G
PCR :	Polymerase Chain Reaction
DDT :	Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
WHO :	World Health Organization
<i>Kdr</i> :	Knock -Down resistance
EDS :	Enquête Démographique et de Santé
CTA :	Combinaison Thérapeutique à base de l'Artémisinine
LIV :	Lutte Intégrée contre les Vecteurs
LAV :	Lutte antivectorielle
MIILD :	Moustiquaires Imprégnées d'insecticide à Longue durée d'action
GPIRM :	Global Plan for Insecticides Resistance Management
SNIGS :	Système National d'Information et de Gestion Sanitaire
LLIN:	Long-Lasting Insecticidal Nets
MII :	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides
LQAS :	Lot Quality Assurance Sampling

ITN :	Insecticide-Treated Nets
GE :	Goutte Epaisse
UNICEF :	Fonds des Nations pour l'Enfance
<i>P.f.</i> :	<i>Plasmodium. falciparum</i>
Hb :	Taux d'hémoglobine
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
TDR :	Tests de Diagnostic Rapide
HRP2 :	Histidin Rich Protein 2
LDH :	Lactate Déshydrogénase
ELISA :	Enzym Linked Immunosorbent Assay
Ac :	Anticorps
CSP :	Circum-Sporozoitic Protein
AChE :	Acétylcholinestérase
CNaVdp :	Canal Sodium Voltage dépendant
TIE :	Taux d'Inoculation Entomologique
R ⁺⁺⁺	zone de forte résistance
R ⁺	zone de faible résistance
R ⁺⁺	zone de résistance suspectée
RGPH :	Recensement Générale de l'Habitat et de la Population
TM :	Taux de Mortalité
ONG :	Organisation Non Gouvernementale
µL :	microlitre
NaOH	Hydroxyde de Sodium
OR :	Odd Ratio
pH :	Potentiel Hydrogène
EP :	Efficacité Protectrice

FS : Frottis Sanguin

Liste des figures

- Figure 1 :** Répartition des zones impaludées dans le monde d'après l'OMS en 2013
- Figure 2 :** Répartition des zones impaludées en Afrique : le Projet MARA/ARMA en 2012
- Figure 3 :** Carte de la prévalence du paludisme au Bénin
- Figure 4 :** Cycle de développement du paludisme
- Figure 5 :** Recherche d'antigènes circulant de *P. falciparum* à l'aide de TDR
- Figure 7 :** Distribution globale des vecteurs principaux et secondaires du paludisme dans le monde
- Figure 8 :** Principaux mécanismes de résistances aux insecticides chimiques chez les insectes
- Figure 9 :** Distribution de la résistance à la deltaméthrine chez *An. gambiae* dans les quatre communes du Plateau
- Figure 10:** Villages cibles du département du Plateau (Bénin)
- Figure 11:** Origines des MIILD
- Figure 12:** Utilisation des MIILD selon les localités de faible et de forte résistance des vecteurs
- Figure 13:** Taux des MIILD utilisées dans les groupes cibles et non cibles
- Figure 14 :** Capture de nuit sur appât humain
- Figure 15 :** Système d'identification d'une lame de goutte épaisse prête à être colorée
- Figure 16 :** Illustration d'un papier de confetti
- Figure 17 :** Réponse IgG anti-salivaire totale chez 240 individus selon la zone de forte et de faible résistance et l'utilisation des MIILD
- Figure 18 :** Réponse IgG anti-salivaire totale chez 240 individus suivant les sites et selon qu'ils soient infectés ou non
- Figure 19 :** Réponse IgG anti-salivaire totale chez 240 individus suivant les cas et les témoins selon qu'ils aient utilisé ou pas de MIILD dans les deux types de localités
- Figure 20:** Carte montrant les villages de l'étude dans le département du Plateau
- Figure 21 :** Formes moléculaires de *An. gambiae* collecté par village
- Figure 22 :** Prévalence du paludisme pour chaque village en fonction de la mortalité à la deltaméthrine
- Figure 23 :** Les observations réalisées au cours du suivi des enfants de la cohorte
- Figure 24 :** Répartition des prélèvements en fonctions des zones, de l'état clinique des enfants et des observations réalisées sur les MIILD

Figure 25: Evaluation des incidences cumulées du paludisme maladie dans les trois types de localités

Figure 26 : Evaluation des incidences d'infestation au niveau de chaque cluster en fonction des trois taux de mortalité à la deltaméthrine

Figure 27: Evolution des incidences d'infestation au niveau de chaque cluster en fonction des taux de mortalité à la deltaméthrine rapprochés de la période de prospection larvaire.

Figure 28: Evaluation des taux d'infestation palustre dans les trois types de localités

Liste des tableaux

Tableau I: Statut de la résistance à la deltaméthrine chez *An. gambiae* à Ifangni et Sakété

Tableau II: Statut de la résistance à la deltaméthrine chez *An. gambiae* à Pobè et Kétou

Tableau III : Liste des 32 villages identifiés pour nos travaux

Tableau IV : Caractéristiques de base des ménages enquêtés

Tableau V : Disponibilité des MIILD par cluster selon les statuts des clusters

Tableau VI: Régression multivariée sur la disponibilité des MIILD

Tableau VII: Régression multivariée sur l'utilisation des MIILD

Tableau VIII: Conditions physiques des MIILD

Tableau IX : Taux de piqûre (ma) de *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistantes 2 ans après la mise en place des MIILD dans le Plateau

Tableau X : Taux d'inoculation entomologique (TIE) observés chez *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistantes 2 ans après la mise en place des MIILD dans le Plateau

Tableau XI : Taux de parturité observés chez *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistantes 2 ans après la mise en place des MIILD dans le Plateau

Tableau XII : Evaluation des variables épidémiologiques chez les cas et les témoins en fonctions des zones de forte et de faible résistance des vecteurs

Tableau XIII : Facteurs associés à la présence de *P.f* dans le sang des enfants de l'étude

Tableau XIV : Analyse de l'efficacité conférée par les MIILD chez les témoins négatifs et les enfants souffrant du paludisme

Tableau XV : Analyse des paramètres associés aux statuts des villages de provenance des enfants

Tableau XVI : Répartition des villages sur la base du statut de faible ou de forte résistance en 2011 selon les communes

Tableau XVII : Résultats des données phénotypiques spécifiques de 2012 et des fréquences *Kdr* des villages

Tableau XVIII : Caractéristiques des enfants utilisés dans l'analyse et de tous les enfants testés de l'enquête

Tableau XIX : Prévalence de *P. falciparum* dans les zones de faible et de forte résistance

Tableau XX : Répartition du taux d'hémoglobine des enfants entre les zones de faible et de forte résistance

Tableau XXI : Effet de la résistance sur l'efficacité des MIILD par la prévalence de l'infection

Tableau XXII : Effet de la résistance sur l'efficacité des MIILD par la prévalence de l'anémie

Tableau XXIII : Evaluation des incidences du paludisme maladie suivant les différentes zones de résistance des vecteurs aux insecticides

Tableau XXIV : Etats cliniques des enfants et l'infestation en fonction des niveaux de résistance

Tableau XXV : Evaluation des densités parasitaires des enfants en fonction des niveaux de résistance des localités de provenance

Tableau XXVI : Influence de la résistance sur l'efficacité protectrice des MIILD dans les différentes localités

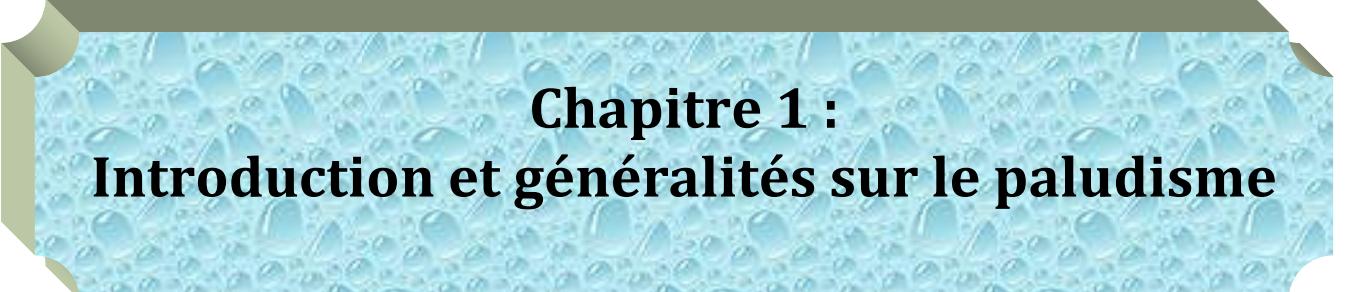
Tableau XXVII : Analyse des résultats d'efficacité protectrice des MIILD dans les clusters suivant les particularités observées dans les différentes zones de résistance

Tableau XXVIII : Analyse multivariée des facteurs associés à la survenue des infestations chez les enfants de moins de 5 ans

Liste des annexes

Annexes 1 : Articles publiés

Annexes 2 : Protocoles



Chapitre 1 : Introduction et généralités sur le paludisme

1. Introduction générale

Les arthropodes constituent l'embranchement le plus important tant par le nombre d'individus présents sur la terre que par la diversité et le nombre d'espèces recensées sur la planète. En effet, huit espèces animales sur dix sont des arthropodes. Beaucoup d'arthropodes piqueurs suceurs (moustiques, glossines, phlébotomes, puces, tiques, réduves...) sont des vecteurs de parasites, de virus et de bactéries, engendrant des maladies graves humaines et animales (Rodhain & Perez, 1985). Parmi ces maladies à transmission vectorielle, le paludisme, une érythrocyopathie, demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale (Collins & Paskewitz, 1995), un peu plus d'un siècle après la découverte par Ross (entre 1895 et 1898) du rôle vecteur des moustiques diptères dans la transmission d'hématozoaires du genre *Plasmodium* (agents pathogènes du paludisme).

Le premier combat contre le paludisme reposait sur l'assainissement de l'environnement qui consistait à éliminer les gîtes larvaires, source de développement du moustique. Il a été relayé quelques décennies plus tard par l'utilisation d'extraits de plantes à activités insecticides notamment les extraits des pyrèthres (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) et surtout par l'utilisation à grande échelle du Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane (DDT) dont les propriétés insecticides ont été découvertes en 1939 avant le déclenchement de la deuxième guerre mondiale (Müller, 1955). Les succès fulgurants des premières heures enregistrés avec le DDT conduisirent au concept d'éradication totale du vecteur, slogan des grands programmes de lutte contre le paludisme à l'époque (OMS, 1957). Cependant, ce concept fut très vite abandonné car si l'éradication totale du vecteur a été réalisée avec succès dans certaines régions en Europe et aux USA, elle connut des échecs dans les savanes tropicales d'Afrique (Cavalie & Mouchet, 1961; Mouchet & Hamon, 1963).

Première affection parasitaire mondiale, le paludisme menace aujourd'hui plus d'un milliard de personnes situées dans la ceinture de pauvreté (WHO, 2012). Il constitue un fléau lourd de conséquences non seulement pour la santé, mais aussi pour le développement socioéconomique. Il est endémique dans 109 pays et près de 3,3 milliards de personnes (soit 50% de la population mondiale) sont exposées à cette maladie (WHO, 2012). Chaque année, 35 millions de cas sont déclarés officiellement mais les estimations révèlent 200 à 300 millions de cas cliniques par an (WHO, 2008). Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est responsable de 627 000 de décès par an, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans (77%) et les femmes enceintes. Près de 90% des cas de décès touchent les pays de l'Afrique sub-saharienne où le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur (WHO, 2013).

Le paludisme joue un rôle majeur dans le faible développement économique de certaines régions endémiques où sa transmission est très intense (Snow *et al.*, 2005). De plus, le paludisme urbain est devenu une réalité dans la plupart des villes de ces régions, surtout dans celles grandissantes de l'Afrique subsaharienne (Akogbéto *et al.*, 1992 ; Robert *et al.*, 2003), et problématique du fait qu'environ 54% de la population africaine habiteront les villes en 2030 (Hay *et al.*, 2005). Plusieurs stratégies de lutte ont été développées à la fois contre le parasite (diminution du nombre de porteurs de gamétocytes) et les vecteurs (diminution de la population vectrices essentiellement par l'utilisation d'insecticides). Cependant, la prévalence du paludisme se maintient toujours et une augmentation de son incidence est aujourd'hui observée dans certaines régions endémiques, malgré les énormes efforts de lutte consentis (Greenwood *et al.*, 2008). Ces résultats sont liés aux limites d'efficacité de chacune des méthodes actuelles de lutte, aux problèmes socio-économiques et culturels que traverse l'Afrique, à l'apparition et à la rapide diffusion des résistances des parasites aux médicaments et des anophèles vecteurs aux insecticides dans l'attente d'un vaccin qui n'est toujours pas disponible malgré la pléthore d'antigènes candidats vaccins (Phillips, 2001 ; Hemingway *et al.*, 2002; Greenwood *et al.*, 2005, 2008).

Au Bénin, le paludisme demeure la principale cause de recours aux soins dans les formations sanitaires et représente 43% de toutes les affections enregistrées en 2011 (SNIGS/MS, 2011). Les axes stratégiques de lutte contre le paludisme sont de troisième génération et reposent sur la prévention, la prise en charge des cas intégrant la confirmation de tous les cas avant traitement et l'utilisation des Combinaisons thérapeutiques à base de l'Artémisine (CTA), la surveillance de l'efficacité des antipaludiques, le suivi de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action ainsi que la surveillance épidémiologique, entomologique et la communication pour un changement de comportement (Plan Stratégique National, 2011).

Le principal moyen de prévention utilisé est la lutte anti vectorielle et elle repose essentiellement sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée (MIILD) et la pulvérisation intra-domiciliaire (PID). Il y a quelques années, les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) de type conventionnel se sont rapidement imposées comme une solution pour réduire l'incidence de la maladie (Lindsay & Gilson, 1998; Coosemans & d'Alessandro, 2001). Malgré leur efficacité notée dans la lutte contre le paludisme, on a constaté une faible observance de la réimprégnation des moustiquaires par les populations. Cette réimprégnation est pourtant nécessaire pour la pérennité de leur efficacité. En effet,

initialement, les techniques d'imprégnation des moustiquaires entraînaient une perte d'efficacité relativement rapide des MII et nécessitaient un retraitement régulier à l'aide de solutions insecticides (Maxwell *et al.*, 2003). Pour résoudre les difficultés liées à l'imprégnation, des avancées récentes des méthodes d'imprégnation de moustiquaires ont permis l'essor d'une nouvelle génération de moustiquaires, les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue-durée (MIILD) ou *Long-Lasting Insecticidal Nets* (LLINs) qui ne nécessitent point de réimprégnation. La présence de l'insecticide à l'intérieur de leurs fibres ou fixé à la surface à l'aide d'une résine permet la conservation de leur efficacité pendant plusieurs années et/ou après de nombreux lavages (Graham *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007; Kilian *et al.*, 2008). Ce concept a été accepté par les paludologues et le modèle MIILD a fait progressivement son entrée dans divers pays à travers les programmes nationaux de lutte contre le paludisme (PNLP) et divers organismes de santé (Coosemans & d'Alessandro, 2001).

L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action constitue aujourd'hui l'une des principales méthodes de prévention de masse applicable efficacement contre le paludisme (Lengeler, 2004a ; Greenwood *et al.*, 2005). La preuve de l'efficacité des moustiquaires imprégnées est bien connue (Lengeler, 2000 ; Lengeler, 2004b) et des efforts de sa distribution massive sont en lien avec les recommandations de l'OMS (Guyatt *et al.*, 2002; Grabowsky *et al.*, 2005a; Grabowsky *et al.*, 2005b; WHO, 2005 ; Eisele *et al.*, 2006; Thwing *et al.*, 2008). Les pyréthrinoïdes ont été les seuls insecticides recommandés par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires en raison de leur rapidité d'action, leur effet excito-répulsif, leur faible dose d'utilisation, et leur bonne tolérance pour l'homme (Zaim & Guillet, 2002 ; OMS/AFRO, 2012)

Beaucoup d'efforts ont été ainsi consentis pour augmenter l'accessibilité des populations aux moustiquaires imprégnées en particulier aux enfants de moins de cinq ans et aux femmes enceintes. L'Enquête Démographique de Santé réalisée au Bénin en 2006 a montré que seulement 33% des enfants âgés de moins de cinq ans et 32% des femmes enceintes dormaient sous moustiquaires imprégnées (EDS-III, 2006). Dans le but d'atteindre le seuil de couverture chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes, une initiative soutenue par la Banque Mondiale et le Fonds Mondial a permis au Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) de mener des campagnes de sensibilisation et de distribution gratuite de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD) sur l'ensemble du territoire national en octobre 2007. Un an après la campagne de distribution

massive de moustiquaires imprégnées aux enfants âgés de moins de cinq ans et aux femmes enceintes, une évaluation a été organisée en novembre 2008, pour apprécier le niveau de satisfaction basé sur quelques indicateurs de lutte contre le paludisme à savoir la couverture en moustiquaires et leur utilisation par zone sanitaire via la méthode LQAS. Les résultats provisoires ont montré que la proportion de ménages possédant au moins une moustiquaire imprégnée était de 72% et la proportion de ménages ayant des enfants de 0 à 59 mois dans lesquels au moins une moustiquaire imprégnée a été retrouvée était de 86% dans les départements de l’Ouémé et du Littoral. En revanche, la proportion d’enfants de 0 à 59 mois ayant dormi sous une moustiquaire imprégnée au cours de la nuit précédente était de 59% dans les mêmes départements (PNLP, 2009). Ces taux sont passés respectivement à 60% et 64% en 2010 selon l’enquête de suivi des indicateurs de lutte contre le paludisme ; taux bien en deçà du seuil de couverture de 80% préconisé par l’Organisation Mondiale de la Santé (PNLP, 2010).

Le succès des MIILD dans la prévention du paludisme vient du fait qu’elles procurent à la fois une protection individuelle efficace pour les utilisateurs et une protection communautaire si le taux de couverture en moustiquaires est suffisamment élevé pour diminuer la capacité vectorielle (WHO, 2008). En vue d’atteindre l’accès universel, le PNLP a organisé en collaboration avec ses partenaires en Juillet 2011 une campagne nationale pour la couverture totale de la population (une MIILD pour 2 personnes) afin d’obtenir un « effet de masse » sur la population anophélienne et la transmission du paludisme. Cette campagne a permis de distribuer près de cinq millions de MIILD avec une couverture nationale de 91% (PNLP, 2011). Selon l’enquête de couverture et d’utilisation réalisée 4 mois après cette campagne d’accès universel, plus de 86% des ménages parcourus dans les douze départements du pays disposaient de MIILD et l’utilisation était nettement améliorée (Tokponnon *et al.*, 2013). Après la campagne de masse de 2011, la distribution de routine de MIILD a été poursuivie chez les enfants de moins d’un an à travers la vaccination anti-rougeole et les femmes enceintes à travers la consultation prénatale. Pour renforcer la distribution de routine en vue du maintien de la couverture universelle, il est également organisé une distribution de MIILD au profit des écoles primaires. Les travailleurs des entreprises et autres groupes sociaux organisés bénéficient d’une distribution à coût réduit à travers un plan de marketing social des MIILD pour maintenir l’accès universelle.

Malheureusement, la résistance de *An. gambiae* s.s aux pyréthrinoïdes s’est propagée dans les régions endémiques et de ce fait menacent sérieusement la promotion de ce moyen de lutte.

En effet, la résistance des moustiques aux insecticides est apparue en Afrique depuis les années 60. Cette résistance aux insecticides est de plus en plus répandue et touche désormais près des deux tiers des pays où la transmission persiste. Elle concerne toutes les principales espèces de vecteurs et toutes les classes d'insecticides (GPIRM, 2012). Les premiers cas ont été notés au Burkina avec l'apparition de la résistance de *An. gambiae* à la Dieldrine, puis un an plus tard au DDT (Hamon & Mouchet, 1961). Concernant les pyréthrinoïdes, l'OMS, en 1987, a signalé la résistance à ces produits chez *An. arabiensis* au Soudan et chez *An. gambiae* au Nigéria (WHO, 1976). Cette résistance fut observée après sélection au laboratoire, mais elle était relativement faible (Malcolm, 1988). De nombreux autres cas sont décrits en Afrique de l'Est (Vulule *et al.*, 1994; Stump *et al.*, 2004). 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 Faso (Chandre *et al.*, 1999; Diabaté, 2002), 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 qu'en zones rurales (Chandre, 1999; Akogbéto et Yacoubou, 1999 ; Akogbéto *et al.*, 2005 ; Fanello *et al.*, 2003a ; Awolola *et al.*, 2003; N'Guessan *et al.*, 2007 ; Corbel *et al.*, 2007; Djogbénou *et al.*, 2008 ; Djènontin *et al.*, 2009 ; Yadouléton *et al.*, 2010 ; Djègbé *et al.*, 2011 ; Ossè *et al.*, 2012).

Malgré la résistance développée par *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes, les moustiquaires imprégnées sont efficaces en zone de résistance des vecteurs aux insecticides (Henry *et al.*, 2005) et confèrent une protection à travers leurs rôles de barrière mécanique (Curtis *et al.*, 1996). Il est à noter aussi qu'une étude récente menée au sud du Bénin a montré un accroissement de l'efficacité lorsqu'on améliore le taux d'utilisation des MIILD malgré la présence de la résistance (Damien *et al.*, 2010).

Cependant, N'guessan *et al.* (2007) ont noté une baisse de l'efficacité des moustiquaires imprégnées et des pulvérisations intra domiciliaires de lambdacyhalothrine dans les zones de forte résistance des anophèles au sud Bénin. Si ces résultats semblent préoccupants, ils demandent à être replacés dans leur contexte comme cela a été fait dans la discussion de cet article car il faut savoir que l'étude a été faite à l'échelle expérimentale des cases pièges et donc il est difficile d'extrapoler ce que l'on obtiendrait à l'échelle communautaire. Aussi, les travaux de Asidi *et al.* (2012) ont montré une perte de protection en communauté lorsqu'on dort sous une moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action dans des localités

où les moustiques sont résistants aux pyréthrinoïdes. Par ailleurs, certains experts s'inquiètent qu'il puisse exister des cas de résistances non détectés en raison de la difficulté à faire le lien entre l'augmentation des cas de paludisme et les preuves de résistance des vecteurs aux insecticides. Selon l'OMS, bien qu'il soit nécessaire d'examiner la question de façon plus approfondie pour mieux comprendre l'impact opérationnel dû à la résistance aux insecticides sur l'efficacité des interventions antivectorielles, cela ne doit pas empêcher la communauté de lutte contre le paludisme de prendre des mesures immédiates.

Il est donc fondamental d'étudier l'efficacité opérationnelle des MIILD distribuées par le Programme National de Lutte contre le Paludisme en 2011 dans les endroits où les vecteurs sont sensibles et où ils ont développé une forte résistance vis-à-vis des insecticides (GPIRM, 2012).

Les résultats des travaux effectués par le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sur la sensibilité des populations d'*An. gambiae* récoltées dans différentes localités des départements du Mono-Couffo, de l'Ouémedé - Plateau, de l'Atlantique - Littoral et du Zou ont constitué la base du choix de la zone d'étude. Il s'agit du département du Plateau où, en plus des zones de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes, quelques zones de sensibilité ont été mises en évidence (Yadouléton *et al.*, 2010). Mais en raison du faible nombre de localités où *An. gambiae* est sensible aux pyréthrinoïdes, nous avons réalisé l'étude dans deux catégories de localités : celles où la résistance est considérée comme faible et celles où elle est considérée comme forte.

C'est pourquoi la présente étude intitulée « **Evaluation des aspects épidémiologiques du paludisme en zone de forte et de faible résistance des vecteurs aux insecticides dans le département du Plateau au Bénin** » a été initiée. Ce travail qui constitue l'essentiel de nos travaux de recherche en thèse, associe à l'entomologie, la parasitologie, des aspects cliniques et immunologiques afin de déterminer si la résistance des vecteurs aux insecticides représente un obstacle sérieux à l'efficacité des MIILD au Bénin.

Plusieurs hypothèses justifient ce travail :

- i) la transmission du paludisme est plus importante en zone de forte résistance des vecteurs aux insecticides par rapport aux zones où les vecteurs sont sensibles;
- ii) l'utilisation des MIILD au sein des ménages et l'intégrité physique de ces MIILD sont influencées par la résistance des vecteurs aux insecticides;

iii) l'efficacité des MIILD varie en zones de forte et de faible résistance des vecteurs aux insecticides;

iv) les indicateurs épidémiologiques du paludisme sont modifiés par la résistance des vecteurs aux insecticides;

Le principal objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides sur la transmission, l'incidence du paludisme, et la prévalence de *Plasmodium falciparum* en zones de forte et de faible résistance des vecteurs aux insecticides.

Plus spécifiquement, nous allons:

- i) identifier des localités de forte et de faible résistance des vecteurs aux insecticides;
- ii) évaluer la couverture, l'utilisation et l'intégrité physique des MIILD dans les deux zones;
- iii) suivre la transmission du paludisme dans les deux catégories de zones;
- iv) évaluer l'efficacité protectrice des MIILD et mesurer la prévalence de *Plasmodium falciparum* et de l'anémie chez les enfants âgés de moins de 5 ans vivant dans les différentes zones au niveau des formations sanitaires;
- v) apprécier l'incidence palustre et les densités parasitaires chez des enfants de moins de 5 ans dans les différentes localités à travers un suivi longitudinal d'une cohorte.

La présente thèse est scindée en **sept** chapitres dont les contenus sont en rapport avec le sujet. Ensuite, leur chronologie dans la thèse a été pour nous un élément capital. Cette chronologie est basée sur l'évolution des idées dans un esprit d'enchaînements progressifs pour aboutir à la conclusion générale. Il s'agit pour nous de pouvoir disposer des informations scientifiques pour apprécier l'influence de la résistance sur l'efficacité des moustiquaires mises en place par le PNLP.

Après l'introduction qui nous a permis de situer le sujet, d'émettre les hypothèses de base et de fixer les objectifs à atteindre, nous avons rappelé, dans la première partie de la thèse, l'épidémiologie du paludisme dans le monde, en Afrique et au Bénin, les stratégies de lutte et de l'évaluation de l'efficacité des interventions de lutte contre le paludisme. Ensuite, nous avons fait un état des lieux des insecticides, des types de résistance aux insecticides susceptibles de compromettre les programmes de lutte et les stratégies de gestion de cette résistance (**chapitre 1**).

Au début de la thèse, nous avons conduit une étude préliminaire en vue de choisir les villages qui abriteront les travaux. Les larves de *An. gambiae* ont été prospectées et les moustiques adultes obtenus après leur élevage à l'insectarium ont subi des tests de sensibilité à la

deltaméthrine. Les taux de mortalité obtenus après une exposition des femelles de 2 à 5 jours aux papiers imprégnés de cet insecticide ont permis de distinguer les villages de faible et de forte résistance. Toutefois, dans chaque chapitre, il a été réalisé un bref résumé du chapitre précédent (**chapitre 2**).

Etant donné que l'étude a pour but de comparer l'influence de la résistance sur l'efficacité des MIILD, en dehors des facteurs de résistance, "toute chose doit être égale par ailleurs" dans les deux catégories de villages. Ainsi dans les villages de faible et de forte résistance, nous avons entrepris une étude (**chapitre 3**) pour évaluer le taux de couverture, d'utilisation et de l'intégrité physique des MIILD. L'objectif est de s'assurer que ces taux sont similaires dans les deux catégories de villages.

Dans **le quatrième chapitre**, nous avons comparé le niveau de la transmission dans les villages de faible et de forte résistance. Nous avons réalisé des captures de moustiques sur appât humain chaque mois et déterminé le taux d'inoculation entomologique dans un groupe de villages où les vecteurs sont fortement résistants. Ce taux a été comparé à celui enregistré dans le groupe de villages de faible résistance.

Les résultats entomologiques ont été corrélés avec les données parasitologiques. Ainsi, dans le **cinquième chapitre**, nous avons réalisé chez les enfants âgés de moins de 5 ans vus en milieu de soins et provenant des villages de faible et forte résistance une évaluation de l'efficacité protectrice des MIILD. A partir des résultats de la Goutte Epaisse (GE) réalisée chez des cas (enfants vus avec fièvre c'est-à-dire à la température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C) et des témoins (enfants vus sans fièvre c'est-à-dire, à la température axillaires inférieure à 37,5°C) nous avons dans un premier temps cherché à savoir si ceux qui utilisent les MIILD et qui proviennent des villages de forte résistance ont plus de risque de faire le paludisme que les autres. Les expositions aux piqûres de moustiques infestés ont été aussi évaluées à travers le dosage des anticorps anti-salivaires dans le sang et ont permis de déterminer l'efficacité des MIILD utilisées par les enfants. Dans un second temps, nous avons étudié l'impact de l'utilisation de ces MIILD sur la prévalence de l'infestation palustre et de l'anémie dans les villages de faible et de forte résistance à travers une enquête transversale.

Le sixième chapitre est orienté sur l'étude d'une cohorte d'enfants de moins de 5 ans suivis activement tous les mois dans les différents villages. Pour chaque enfant, il a été réalisé une

Goutte Epaisse (GE) le premier mois du suivi, un traitement systématique de tous ceux qui sont positifs à l'aide d'une Combinaison Thérapeutique à base de l'Artémisinine (CTA). Chaque mois, des prélèvements sanguins ont permis de réaliser la GE et le FS au laboratoire. La température axillaire a été prise ainsi que tout antécédent de fièvre documenté à travers des visites à domicile réalisées. L'évolution des incidences mensuelles par localité a été évaluée ainsi que les variations des DP. La corrélation des résultats ainsi obtenus avec ceux des données entomologiques a été réalisée.

Enfin, les différents résultats obtenus sont discutés dans leur ensemble, suivis d'une conclusion et de perspectives de recherche concernant l'avenir de l'efficacité des moustiquaires malgré la forte progression de la résistance des vecteurs aux insecticides dans le pays (**chapitre 7**).

2. Généralités sur le paludisme

2.1 Définition et bref rappel historique

Le paludisme est une maladie parasitaire, due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* et qui sévit dans la plupart des pays tropicaux. Un siècle après la découverte du rôle vecteur des moustiques dans la transmission des plasmodes, le paludisme demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale, avec une incidence annuelle estimée à 500 millions de cas cliniques. Le nombre de victimes directes est évalué à un million par an, essentiellement comptées parmi les enfants de moins de 5 ans (Greenwood *et al.*, 2005).

Le terme italien « mal aria » ou mauvais air et le terme francophone « paludisme » introduit par Laveran (1893), traduisent bien la liaison faite par les italiens entre les fièvres et les miasmes véhiculés dans l'air. En 1717, Lancisi suggérait que le paludisme était dû à un poison des marais transmis par des moustiques qui inoculent « les mauvaises humeurs dans le sang ».

A la fin du XIXème siècle, le médecin militaire français Alphonse Laveran fut le premier à démontrer la nature parasitaire de l'affection en détectant « des éléments pigmentés dans les globules rouges des malades atteints de fièvres palustres, qui se présentent sous forme de croissant, de sphères, de flagelles » et appella en 1881 *Oscillaria malariae* le parasite responsable. Entre 1895 et 1898, Ross montra que le paludisme pouvait être transmis par les moustiques. Grassi, Bastianelli et Bignami en 1899 décrivirent le cycle complet de développement de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae* chez les anophèles.

Il est transmis le plus souvent d'un individu à un autre par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Le paludisme peut également être transmis par une transfusion sanguine provenant d'une personne infectée. Des dons de sang provenant de personnes à demi-immunisées, ne présentant pas de symptômes cliniques, peuvent aussi contenir des parasites du paludisme. On peut assister à des cas de paludisme congénital, où la mère contaminée transmet le parasite à son enfant avant ou pendant l'accouchement (OMS, 1996).

2.2 Epidémiologie du paludisme

2.2.1 Importance médicale du paludisme

Dans le monde :

L'un des rares problèmes de santé publique qui a traversé les siècles sans jamais perdre son importance, le paludisme est endémique dans 99 pays (figure 1) des régions tropicales et

intertropicales d'Amérique du Sud, d'Asie et majoritairement d'Afrique (WHO, 2013) où les conditions climatiques sont particulièrement favorables au développement des moustiques *Anopheles* vecteurs et des Plasmodies humains (Hay *et al.*, 2004, 2009). Sur plus de 3 milliards de personnes à risque (environ 50% de la population mondiale), selon les dernières estimations de décembre 2013, on a enregistré, en 2012, 207 millions de cas de paludisme (avec une marge d'incertitude comprise entre 135 millions et 287 millions) qui ont causé 627 000 décès (avec une marge d'incertitude comprise entre 473 000 et 789 000), soit une diminution de la mortalité de 45% au niveau mondial par rapport à 2000 et de 49% dans la Région africaine de l'OMS (WHO, 2013). La plupart de ces cas mortels (85%) surviennent chez les enfants de moins de cinq ans (WHO, 2008) qui, avec les femmes enceintes (23 millions de grossesses sont menacées chaque année), payent le plus lourd tribu à cette maladie (WHO-Unicef, 2003). Toutefois en Afrique, le taux de mortalité des enfants a diminué de 54% par rapport à 2000 (WHO, 2013).

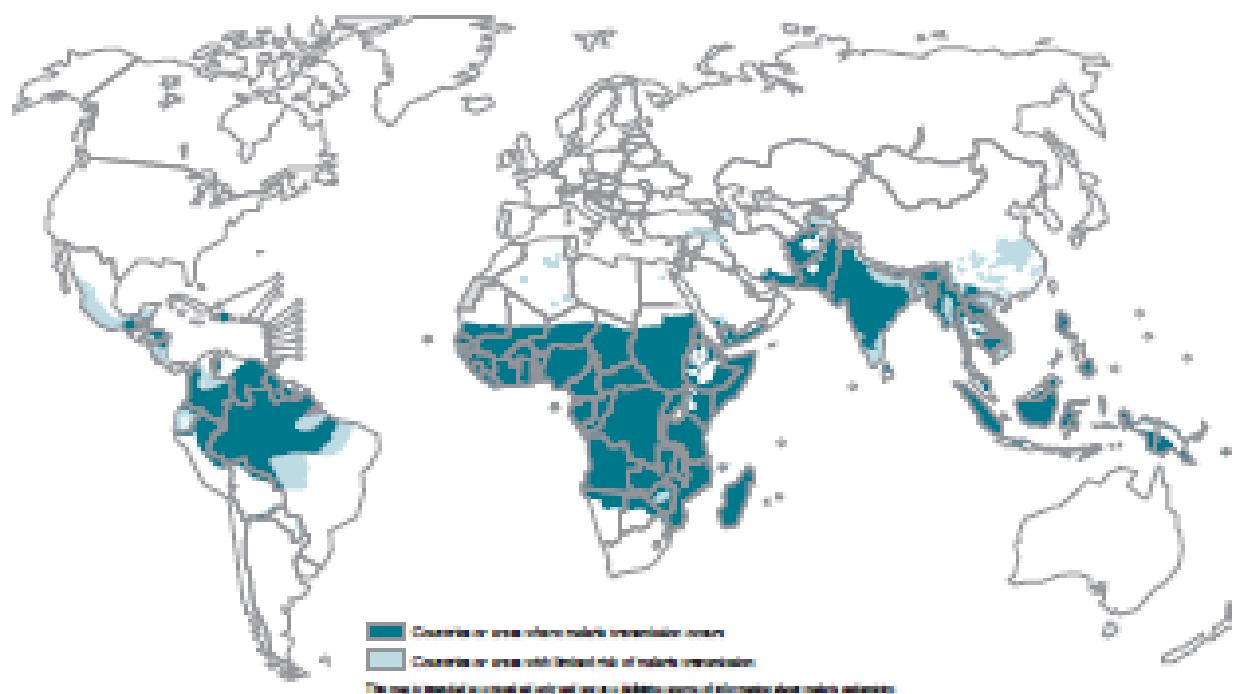


Figure 1 : Répartition des zones impaludées dans le monde d'après l'OMS en 2013

En Afrique

Quatre vingt et onze pour cent (91%) des cas annuels de décès d'enfants de moins de cinq ans (environ 596 000 cas) sont enregistrés en Afrique sub-saharienne (Figure 2) où 174 millions de cas annuels sont enregistrés (WHO, 2012). *P. falciparum*, l'espèce la plus fréquente et la plus dangereuse entraînant chaque année 2 à 3 millions de formes graves (Greenwood *et al.*, 2005, 2008), avec la survenue d'accès cérébraux et d'anémies sévères surtout chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes, est responsable de 80 à 95% des infections palustres annuelles (WHO, 1996) chez près de 610 millions d'Africains exposés (Guerra *et al.*, 2008). Le paludisme, en occasionnant un déficit de poids à la naissance, est aussi responsable de 5-10% des cas de mortalités néo-natales et infantiles en Afrique sub-saharienne (Guyatt & Snow, 2001). Dans cette région, où le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur de *P. falciparum* (Mouchet *et al.*, 2004), le paludisme est responsable de 40% des dépenses de santé publique, de 30-50% des admissions dans les hôpitaux et de pas moins de 50% des consultations externes (WHO-Unicef, 2003). Il y est la cause des pertes évaluées à 12 milliards de dollars US chaque année (Greenwood *et al.*, 2005).

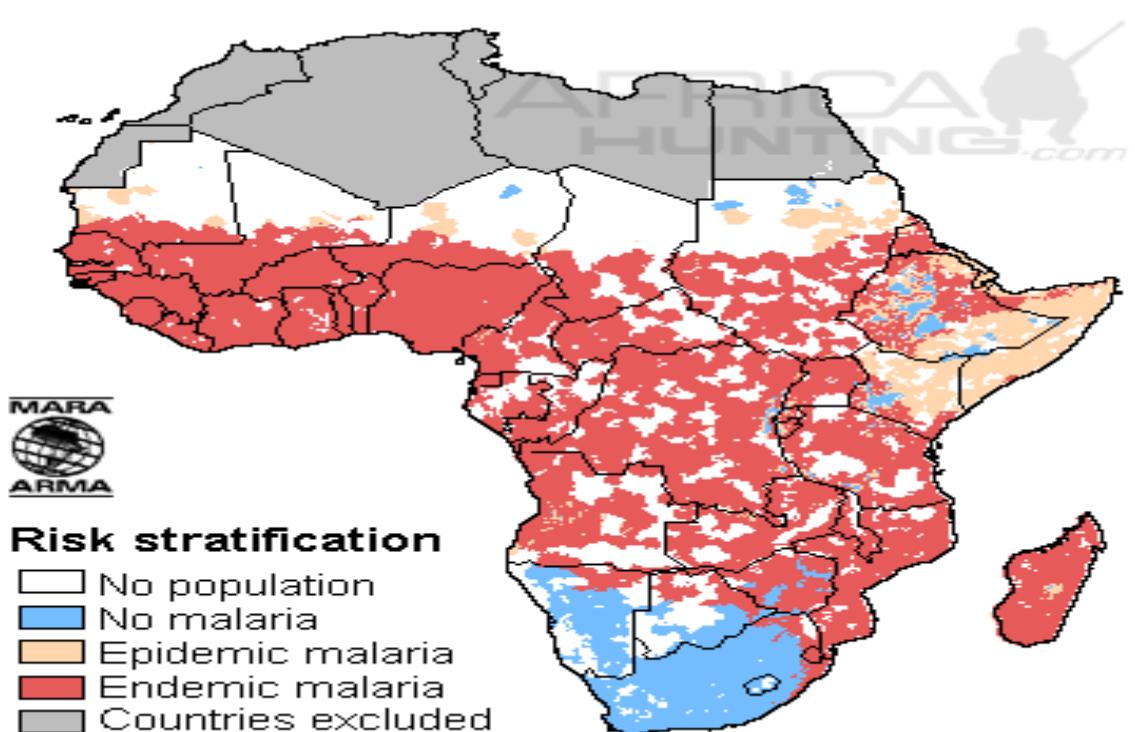


Figure 2 : Répartition des zones impaludées en Afrique : le Projet MARA/ARMA en 2012

Au Bénin

Le paludisme constitue aussi un problème de santé publique majeur au Bénin. En effet, il y sévit de façon endémique (avec différents niveaux d'endémicité) avec une transmission saisonnière. Selon l'Annuaire des Statistiques Sanitaires 2012, le paludisme représente respectivement 41,7% et 47,6% des motifs de consultation au sein de la population générale et chez les enfants de moins de cinq ans. L'incidence de la maladie en 2012 est de 15,7% en population générale et 16,1% chez les enfants de moins de cinq ans. Toute la population béninoise est exposée au paludisme ; toutefois les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans continuent d'être les groupes les plus vulnérables et sont exposés aux formes graves de la maladie (SNIGS 2012). Le paludisme est la plus grande cause des demandes de soins de santé et la principale cause de mortalité, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans (PNLP- Bénin, 2013).

Les vecteurs majeurs appartiennent aux complexes *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. nili* sont suspectés de jouer un rôle « secondaire » dans la transmission de *P. falciparum* (PNLP- Bénin, 2010). Ce dernier est le principal agent du paludisme (responsable de plus 95% des cas), mais des associations avec *P. malariae* et *P. ovale* ont été retrouvées dans 1-5% et 1-5% des cas respectivement (Damien *et al.*, 2010). La figure 3 indique la répartition de la prévalence du paludisme dans les départements du Bénin.

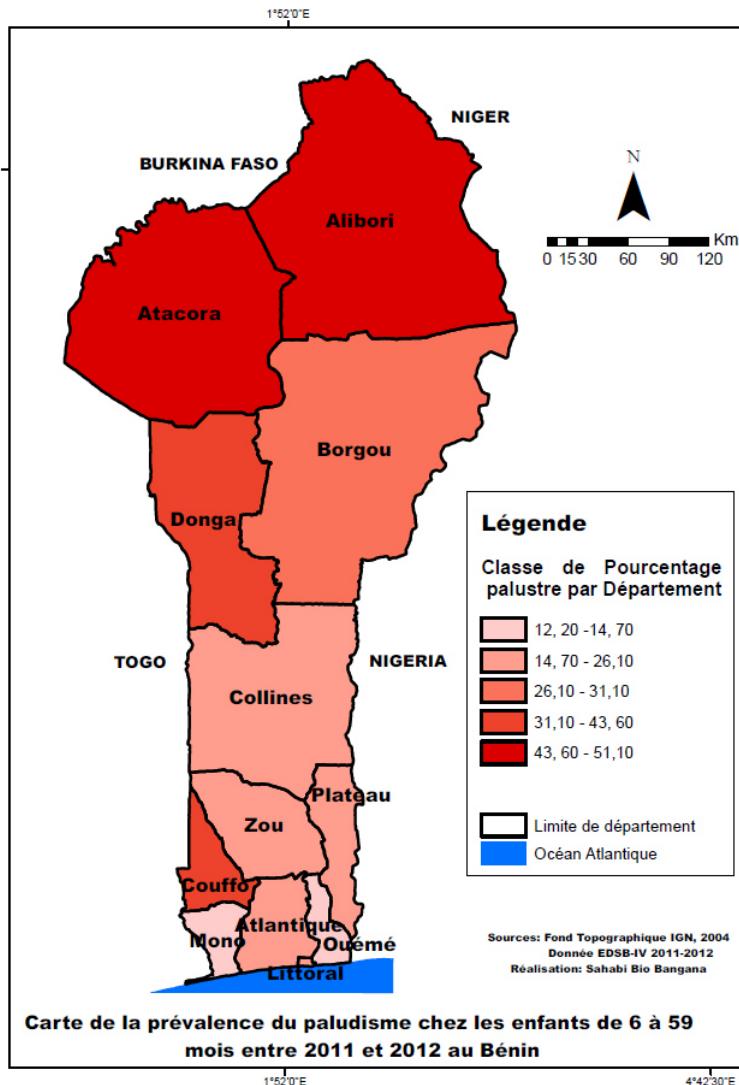


Figure 3 : Carte de la prévalence du paludisme au Bénin

2.2.2 Les protagonistes

2.2.2.1 Les agents pathogènes

Les agents responsables du paludisme sont des protozoaires de l'embranchement des Apicomplexa (protozoaires à appareil apical complexe), de la classe des Sporozoa, de l'ordre des Haemosporidia, de la famille des Plasmodidae et appartiennent au genre *Plasmodium*.

Sur plus d'une centaine d'espèces du genre *Plasmodium* parasitant batraciens, reptiles, oiseaux ou mammifères, seules cinq peuvent infecter l'homme :

- *Plasmodium falciparum* (Welch, 1887) est responsable de la fièvre tierce maligne. Cette espèce est la plus fréquente en Afrique sub-saharienne où 80 à 95% des cas de la maladie lui sont associés. Elle est aussi la plus redoutable car pouvant être à l'origine des formes graves, voire mortelles en l'absence de traitement approprié (WHO, 2000).

- *Plasmodium vivax* (Grassi, 1890) responsable de la fièvre tierce bénigne. Elle est aussi très répandue dans le monde et évolue avec des rechutes à long terme. Elle est rare en Afrique, plus fréquente en Asie, Océanie, Amérique du Sud et Centrale.
- *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) est l'agent aussi d'une fièvre tierce bénigne. Elle est très proche de *P. vivax* avec laquelle elle a été très longtemps confondue. Elle évolue à long terme et est donc considérée comme peu pathogène. Elle est rare et se rencontre presque exclusivement en Afrique de l'Ouest.
- *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881) est responsable d'une fièvre quarte et de troubles rénaux.

Elle est responsable d'environ 1% des cas de paludisme seulement. Elle se rencontre surtout en Amérique du Sud où elle est très fréquente dans certaines tribus d'Amérindiens.

- *Plasmodium knowlesi* proche génétiquement de *P. vivax*, et microscopiquement de *P. malariae*. Il a été découvert récemment chez l'homme en Malaisie (mais était connu antérieurement chez le singe) (Cox-Singh *et al.*, 2008; Cox-Singh & Singh, 2008).

Les 3 premières espèces sont spécifiquement humaines alors que les deux dernières sont communes à l'homme et aux grands singes africains.

2.2.2.2 Cycle de développement de *Plasmodium*

Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement du cycle des plasmodes (Figure 4): hôte vertébré où se déroule la multiplication asexuée ou schizogonie et moustique Culicidae du genre *Anopheles* (pour les plasmodes infectant l'Homme), lieu de la multiplication sexuée ou sporogonie.

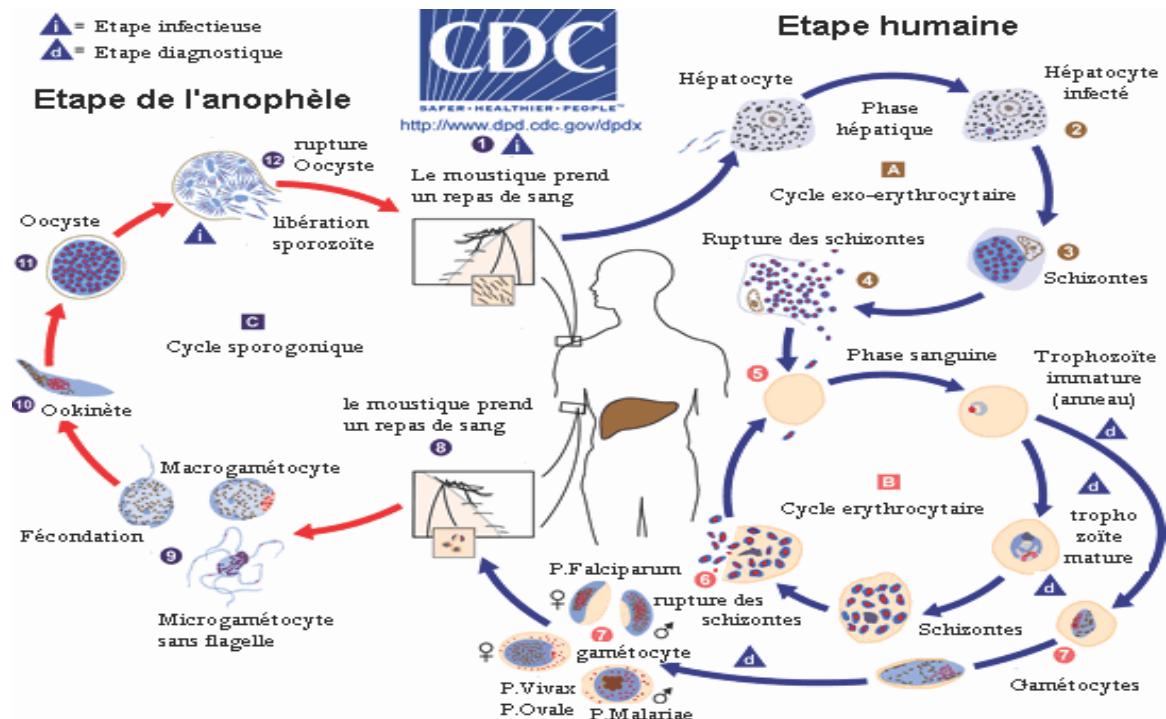


Figure 4 : Cycle de développement du paludisme (Source: <http://www.cdc.gov/malaria/>)

2.2.2.2.1 Schizogonie chez l'Homme

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infesté injecte avec sa salive, au niveau de la peau, des sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires. Ces éléments unicellulaires filiformes, à travers la circulation générale, se répartissent rapidement dans tout l'organisme, pénètrent activement et indifféremment dans différents types cellulaires. Certains sporozoïtes vont cependant pénétrer dans des vaisseaux lymphatiques où ils seront dégradés par le système immunitaire (Amino *et al.*, 2006). Seuls les survivants ayant gagné le foie et franchi une dernière barrière constituée par les cellules de Kupffer pourront poursuivre leur cycle dans les hépatocytes (Ishino *et al.*, 2004). On estime qu'un anophèle infecté peut injecter à son hôte un à 1000 sporozoïtes (120 en moyenne) au moment d'une piqûre (Bejon *et al.*, 2005).

La phase hépatique

Dans les hépatocytes, les sporozoïtes s'arrondissent et se transforment en trophozoïtes. Certains trophozoïtes, par multiplication et développement, évoluent immédiatement jusqu'à maturité pour donner des schizontes alors que d'autres restent sous forme uninucléée et sont appelés hypnozoïtes (Jiang *et al.*, 1988). Ces 2 types d'évolution dépendent de l'espèce

plasmodiale et expliquent les rechutes observées chez *P. vivax* et *P. ovale* chez lesquels les hypnozoïtes (formes dormantes) ont été soulignés contrairement à *P. falciparum* chez qui les sporozoïtes entrent en évolution immédiate (Greenwood *et al.*, 2005). A maturité, les schizontes éclatent, libérant des merozoïtes, nouvelles formes uninucléées qui initieront la phase érythrocytaire en envahissant les globules rouges.

Cette phase hépatique constitue la partie cliniquement silencieuse et asymptomatique du cycle. Elle correspond, en effet, à une période d'incubation dont la durée (5 à 15 jours) et la fréquence sont fonction de l'espèce plasmodiale. La durée de cette phase varie de 5-6 jours chez *P. falciparum* à 10-14 jours, ou occasionnellement plus, chez *P. vivax* (White, 2004).

La phase érythrocytaire

Les merozoïtes, libérés dans le sang par la rupture de l'hépatocyte, envahissent les globules rouges, selon un processus en plusieurs étapes, s'y déplacent par des mouvements amiboïdes vers le centre où ils se transforment en trophozoïtes, sièges d'importantes activités métaboliques (Carter & Miller, 1979). Les trophozoïtes vont ainsi croître en dégradant l'hémoglobine et évoluer en schizontes dans lequel s'accumule l'hémozoïne (pigment malarique, produit de dégradation de l'hémoglobine qui remplit progressivement la vacuole nutritive parasitaire).

De nombreuses divisions nucléaires se produisent dans les schizontes aboutissant ainsi à la formation de nouveaux merozoïtes qui sont libérés lors de l'éclatement des schizontes matures (corps rosacés). Chaque merozoïte peut alors infester une nouvelle hématie et ainsi recommencer le cycle intra-érythrocytaire. La lyse des hématies parasitées par les schizontes mûrs est responsable des accès fébriles, symptômes cliniques caractéristiques du paludisme. Après plusieurs cycles intra-érythrocytaires, une fraction des merozoïtes pénètrent dans les globules rouges et se différencient en gamétocytes mâles et femelles qui, lorsqu'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin, permettent la poursuite du cycle du parasite chez le moustique (Ghosh *et al.*, 2000). La distribution des stades érythrocytaires dans le sang n'est pas toujours homogène (White & Ho, 1992) et, dans certaines circonstances, certains stades parasitaires disparaissent du sang périphérique parce qu'ils sont retenus (ou « séquestrés ») dans les capillaires profonds de différents tissus ou organes profonds (cerveau, cœur, rate, intestin, moelle osseuse et placenta).

2.2.2.2 Sporogonie chez le moustique femelle

En prenant son repas sanguin sur un individu infecté par *Plasmodium*, le moustique absorbe les différents stades du parasite (sexués et asexués) (Robert *et al.*, 1994). Mais seuls les stades sexués (gamétocytes) poursuivront leur développement, les autres étant digérés au niveau de l'estomac de l'insecte (Frischknecht *et al.*, 2004). Rapidement, par expulsion des corpuscules chromatiniens, le gamétocyte femelle se transforme en macrogamète, alors que la microgamétogénèse mâle ou ex-flagellation est plus lente et donne naissance à 8 microgamètes qui vont rapidement à la rencontre du macro-gamète (Rickman *et al.*, 1990). La fécondation donne naissance à un ookinète, œuf mobile qui traverse la paroi stomachale du moustique et migre vers la face externe de l'épithélium intestinal où il s'enkyste pour former l'oocyste mature dans lequel s'individualisent les sporozoïtes (Robert *et al.*, 1994). Libérés à la suite de l'éclatement de l'oocyste, ces derniers vont, via l'hémolymphé, gagner par préférence les glandes salivaires (Davies, 1974) de l'insecte pour être inoculés lors d'une piqûre infectante ultérieure.

2.2.3 Diagnostics de l'infection

Différents moyens directs ou indirects permettent de diagnostiquer le paludisme. Les techniques directes sont essentiellement parasitologiques; les méthodes indirectes font appel à l'immunologie ou à la biologie moléculaire. Un diagnostic basé sur les signes cliniques (symptomatologie) est utilisé pour le diagnostic du paludisme soit direct, soit indirect peut être utilisé en zone d'endémie.

2.2.3.1 Evaluation de la morbidité

La morbidité s'évalue avec de très grandes difficultés car basée sur l'enregistrement des cas de paludisme à partir des signes cliniques, telle que la fièvre, qui ne sont pas forcément spécifiques au paludisme et qui varient avec le degré de transmission (WHO, 2006c).

De plus, le portage asymptomatique de *Plasmodium* est fréquent en zone d'endémie. On distingue : le paludisme simple et le paludisme grave. Dans le cadre du paludisme simple, le diagnostic est basé sur la détection de la fièvre (température axillaire $\geq 37^{\circ}5$ C) ou antécédent récent de fièvre sans signes de gravité.

Le diagnostic du paludisme grave est basé sur la reconnaissance de l'un des signes de gravité suivants :

Manifestations cliniques :

- Prostration ;
- Troubles de la conscience ou coma ;

- Détresse respiratoire (respiration acidosique) ;
- Convulsions multiples (convulsions actuelles ou ATCD de convulsions au cours du présent épisode) ;
- Collapsus cardiovasculaire ;
- Œdème pulmonaire (radiologique) ;
- Saignement anormal ;
- Ictère ;

Aspects biologiques :

- Hémoglobinurie ou urine coca cola ;
- Incapacité de se nourrir ;
- Acidose métabolique (bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L) ;
- Anémie grave ($Hb < 5\text{ g/dl}$ ou $Ht < 15\%$) ;
- Hyperparasitémie ($> 4\%$ chez le sujet non immun ou $> 20\%$ chez le sujet immun) ;
- Hypoglycémie ($< 2,2 \text{ mmol/L}$) (PNLP, 2011).

2.2.3.2 Diagnostic biologique

2.2.3.2.1 Diagnostic biologique non spécifique

La numération de la formule sanguine montre une cytopénie (anémie, leucopénie, thrombopénie) et peut donner une idée sur la gravité du paludisme. Cette méthode n'est pas précise car ces anomalies ne sont pas toujours dues au paludisme même si l'anémie est souvent utilisée dans le diagnostic du paludisme grave chez l'enfant en zone d'endémie. De ce fait, ces méthodes sont imprécises.

2.2.3.2.2 Diagnostic biologique spécifique

Il est basé sur des approches parasitologiques, immunologiques et sur la biologie moléculaire. A cet effet, diverses méthodes et techniques sont utilisées.

Microscopie conventionnelle

C'est la méthode de référence pour la détection des infections plasmodiales reposant sur la mise en évidence microscopique directe des parasites dans le sang étalé en goutte épaisse ou en frottis mince sur une lame de verre et coloré, généralement au Giemsa (Wongsrichanalai *et al.*, 2007).

Le Frottis sanguin

Il se réalise soit par prélèvement capillaire au bout du doigt avec confection immédiate du frottis, soit par ponction veineuse avec prélèvement dans un tube contenant un anticoagulant et réalisation secondaire des lames d'examens. Il permet l'étude de la morphologie des hématozoaires et le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales. Mais il ne permet presque pas le calcul de la densité parasitaire, du fait de la détermination fastidieuse du nombre minimum de champ à lire. Pour le réaliser, on étale environ 1 à 1,5 µl de sang sur une surface de 800mm². L'examen de 200 champs microscopiques couvre alors 0,01 à 0,02 µl de sang, soit 40 fois moins que sur une goutte épaisse.

La goutte épaisse

Examen de référence de l'OMS, elle est très largement utilisée pour le diagnostic de routine du paludisme. Sa sensibilité est 20 à 30 fois plus élevée que celle du frottis mince. C'est une technique de concentration des hématies permettant d'identifier les stades sanguins du parasite (trophozoïtes, merozoïtes et gamétocytes). Elle est réalisée avec 3 à 4 µL de sang étalé sur une surface ronde, carrée ou rectangulaire d'environ 8-10 mm de diamètre ou de côté. Idéalement, 15 à 20 leucocytes doivent être visibles sur les champs microscopiques (oculaires 5x à 7x, objectif 100x à immersion). Dans ces conditions, l'examen de 200 champs microscopiques couvre environ 0,4 à 0,6 L de sang (Manuel des techniques de base pour le laboratoire médicale, 1982).

L'apposition placentaire

Elle consiste à évaluer les infections plasmodiales au niveau des placentas des femmes enceintes, qui constituent avec le nouveau-né des populations à très haut risque de paludisme. Il s'agit d'apposer la face maternelle d'un fragment du placenta sur une lame de verre et rechercher sous microscope d'éventuelles parasites. L'examen histologique du placenta peut aussi être utilisé (Rogerson *et al.*, 2003). Ces méthodes permettent de détecter les plasmodies et le pigment malarique résiduel présents dans des macrophages qui témoignent de l'infection récente ou ancienne de la mère, avec une plus grande sensibilité que la goutte épaisse réalisée avec du sang capillaire (Rogerson *et al.*, 2003).

QBC (Quantitative Buffer Coat TM) Malaria test

Le QBCTM Malaria test repose sur l'isolement des hématies parasitées et la coloration de leur ADN par l'acridine orange, leur concentration dans un tube capillaire par gravimétrie (i.e. centrifugation) et leur détection microscopique en lumière ultraviolette. Le diagnostic

positif repose sur une image associant un noyau et un cytoplasme, en situation intra-érythrocytaire, comparable au diagnostic sur frottis mince. Cependant, les caractéristiques morphologiques permettant le diagnostic d'espèce ne sont pas discernables. Ainsi, le diagnostic d'espèce repose sur le monomorphisme des stades jeunes des formes sanguines et leur répartition homogène dans le capillaire en faveur d'une infection par *P. falciparum*, le polymorphisme des formes parasitaires et leur concentration proche des couches leucocytaires évoquant une autre espèce plasmodiale. Malgré la grande sensibilité de cette méthode, son coût, l'absence d'estimation de la densité parasitaire et de spécificité d'espèces plasmodiales limitent son intérêt en épidémiologie aux recherches des densités parasitaires les plus faibles et au diagnostic des accès palustres chez les individus peu ou non immuns (De Pina *et al.*, 2007).

Tests de Diagnostic Rapide (TDR) par immunocapture d'antigènes plasmodiaux

Il se base sur la migration d'antigènes de plasmodium, contenus dans le sang périphérique, sur une membrane de nitrocellulose et sur leur détection par immunocapture (anticorps fixés sur membrane) et immuno-marquage (anticorps marqué par de l'or colloidal ou du sélénium) (Murray *et al.*, 2008). Ces tests sont faciles et rapides d'emploi (<20 minutes), relativement bon marché et ne nécessitent ni source d'électricité ni entraînement poussé des manipulations (Figure 5). Cependant, certaines études ont rapporté que ces tests, avec une sensibilité de l'ordre de plusieurs centaines de parasites par microlitre de sang (<500/ µl) pour *P. falciparum* seraient moins sensibles que la méthode de goutte épaisse (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). La qualité de ces tests peut varier d'un lot à l'autre et peut être altérée par la température ou des humidités extrêmes. La plupart des tests sont à conserver entre 4 et 30°C, à moins de 70 % d'humidité. La majorité des tests utilisés ne détectent que *P. falciparum*, mais il existe quelques tests qui détectent les autres espèces plasmodiales, selon les antigènes cibles. En pratique, les tests commercialisés combinent souvent la détection de plusieurs antigènes, en fonction des conditions épidémiologiques où ils doivent être employés (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Ces antigènes sont généralement les suivants :

L'HRP2 (histidin rich protein 2) de *P. falciparum* : cet antigène est sécrété par les formes asexuées et les jeunes gamétoцитes et peut persister dans le sang périphérique plus de 15 jours après la disparition des parasites. Sa détection fait l'objet de faux positifs en présence de facteur rhumatoïde ou de faux-négatifs à cause de mutations du gène *hrp* ou de présence d'anticorps anti-HRP2.

La LDH (lactate déshydrogénase) : selon les tests, la LDH de *P. falciparum*, la LDH de *P.*

vivax ou les LDH des quatre principales espèces de *Plasmodium* infectant les humains peuvent être détectées. La sensibilité des tests détectant la LDH est meilleure pour *P. falciparum*. Cet antigène est aussi sécrété par les formes asexuées et les gamétocytes mais il disparaît plus rapidement du sang que l'HRP2.

L’aldolase : des anticorps capables de reconnaître les aldolases de tous les plasmodes humains peuvent être utilisés. La sensibilité de détection de ces antigènes est cependant encore moindre que celle des tests détectant l'HRP2 et la LDH.



Figure 5 : Recherche d’antigènes circulant de *P. falciparum* à l’aide de TDR (Photo Tokponnon)

L'avantage essentiel de ces tests est leur rapidité et leur facilité d'emploi. De plus, ils ne nécessitent pas une formation et ni un entraînement important. Leur défaut majeur est leur manque de sensibilité et l'absence d'estimation de la densité parasitaire. Le manque de sensibilité (faux négatifs) de ces tests est acceptable pour le diagnostic de la morbidité palustre dans les zones d'endémie où les accès palustres s'accompagnent habituellement de densités parasitaires élevées. Il limite cependant leur intérêt pour les études épidémiologiques menées dans les populations asymptomatiques et dans les populations où les densités parasitaires sont basses (Murray *et al.*, 2008). Néanmoins, ces TDR sont très disponibles et constituent actuellement un outil de masse pour la détection des plasmodes en milieu hospitalier ou lors de diagnostics de routine organisés par les PNLP de la plupart des pays endémiques.

Méthodes immunologiques : la sérologie

Les méthodes sérologiques de diagnostic de l'infection palustre reposent sur la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes plasmodiaux. Ces antigènes peuvent être des antigènes natifs présents à la surface ou dans les parasites entiers utilisés en immunofluorescence indirecte (IFI) ou contenus dans des extraits obtenus à partir de parasites en culture et utilisés en ELISA. Ces antigènes peuvent aussi être des protéines recombinantes ou des polypeptides synthétiques. Les antigènes natifs sont généralement des antigènes de stades érythrocytaires asexués, le plus souvent de stades schizontes.

La quantité d'Anticorps dirigés contre de multiples antigènes serait ainsi proportionnelle à l'intensité du contact avec le parasite et à la durée de l'infection (Bruce-Chwatt *et al.*, 1975). La sérologie apparaît être plus sensible que la mise en évidence des parasites, car elle est indépendante des fluctuations de la parasitémie et reste positive en cas de parasitémie subpatente. Ainsi, plusieurs études immuno-épidémiologiques ont montré que la réponse anticorps (Ac) contre certains antigènes des stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires (sanguins) de *P. falciparum* pourraient représenter une « image » du degré de transmission (Ferreira *et al.*, 1998 ; Drakeley *et al.*, 2005). Des protéines des stades précoces (CSP, TRAP, LSA1, SALSA...) considérées pour leur activité immunogénique et leur relation avec la transmission pourraient être de bons marqueurs d'évaluation de l'intensité de la transmission. En effet, dans les années 1990, il a été suggéré que les réponses IgG contre des antigènes des stades merozoïtes et sporozoïtes pourraient être utilisées comme des marqueurs sérologiques de transmission (Webster *et al.*, 1992 ; Ramasamy *et al.*, 1994). Ces méthodes permettaient de distinguer une dynamique de transmission en fonction de la saison et de différencier des foyers avec une forte ou faible exposition au paludisme. Mais les limites majeures de ce type de marqueur immunologique, quand il est évalué chez des enfants exposés, étaient liées aux très faibles niveaux de réponses Ac (très faible titre Ac) et au fort polymorphisme antigénique entre les souches de *Plasmodium* (Ramasamy *et al.*, 1994).

Tests moléculaires

Depuis 1984, les techniques d'amplification génique *in vitro* sont en pleine expansion dans le diagnostic de la présence de *P. falciparum* et les études épidémiologiques sur le paludisme (Franzén *et al.*, 1984). Au départ, ces techniques étaient fondées sur l'hybridation moléculaire de sondes ciblant des séquences spécifiques d'ADN parasites. Aujourd'hui, elles sont basées sur la PCR (« Polymerase Chain Reaction ») qui permet la détection de parasitémies très faibles avec une spécificité de 100%. La limite de détectabilité de la PCR se situe aux

alentours de 0,01 parasites/ microlitre de sang, permettant en théorie de détecter un parasite dans un échantillon analysé de 100 microlitre (Hommel & Schrevel, 1998 ; Druilhe *et al.*, 2001). La PCR est ainsi plus sensible que la microscopie et les techniques de recherche d'antigènes circulants (Rubio *et al.*, 2001 ; Filisetti *et al.*, 2002). Cependant, c'est une technique demandant du personnel qualifié, des locaux et du matériel appropriés et surtout des moyens financiers importants limitant son essor dans les pays impaludés et en particulier au niveau des structures de santé. Leur adaptation au haut débit est cependant possible et leur coût peut être diminué. Ces méthodes sont les seules à permettre, en épidémiologie, de distinguer les populations plasmodiales présentes simultanément dans un même isolat et d'analyser leur diversité génétique et leur dynamique intra-hôte, à l'échelle d'une communauté humaine (*e.g.* un village), d'un pays, d'un continent ou de la planète (Zwetyenga *et al.*, 1999 ; Anderson *et al.*, 2000). Elles peuvent aussi aider à distinguer les recrudescences des nouvelles infections dans les essais d'efficacité des médicaments antipaludiques (Snounou & Beck, 1998; WHO, 2008a). Mais elles ne sont pas encore reconnues comme méthodes de référence car leurs performances et leur fiabilité dépendent de la variabilité génétique des séquences d'ADN plasmodial ciblées (Calderaro *et al.*, 2007).

2.2.4 Pathogenèse symptomatologie du paludisme et traitement

La symptomatologie du paludisme dépend principalement de la virulence du parasite, du niveau d'immunité acquis par l'individu infecté et d'un certain nombre de facteurs génétiques pouvant conditionner la sensibilité des individus à l'infection plasmodiale (Kwiatkowski & Marsh, 1997). Le stade pré-érythrocytaire du parasite n'est responsable d'aucune forme de pathologie. Seul le stade érythrocytaire engendre des symptômes du fait de l'éclatement rythmique des schizontes.

2.2.4.1 Infection asymptomatique et immunité de prémunition

Chez les sujets vivants en zone d'endémie, le parasitisme (présence de l'infection palustre) constant est fréquent. Les taux de prévalence des infections plasmodiales chez les enfants peuvent atteindre 80%, sans qu'aucun symptôme ne laisse supposer la présence d'une infection. C'est le portage asymptomatique de parasites. La durée de survie d'une infection au stade sanguin peut atteindre 1 an pour *P. falciparum* et 3 ans pour *P. malariae* (Covell, 1960) et varie en fonction de l'âge de l'hôte dans ces zones d'endémie (Smith *et al.*, 1999). La sensibilité du sujet au paludisme varie aussi avec l'âge : après 5 ans, les accès graves sont rares et à partir de 10-15 ans les accès simples deviennent de plus en plus bénins. De plus, des

cas graves ont souvent été relevés dans des zones de paludisme instable (transmission saisonnière) et notamment lors d'épidémies contrairement aux zones de paludisme stable (transmission forte et permanente). Ces phénomènes semblent s'expliquer par une acquisition différente de l'immunité anti-palustre, dite « de prémunition » (Sergent, 1950), en fonction du degré de transmission des foyers. Cette immunité traduit un équilibre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition intense. Elle est entretenue par des stimulations antigéniques dues à des infections palustres et à l'exposition aux piqûres anophéliennes infectantes (Struik & Riley, 2004). Son développement dépend du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de transmission au niveau de la zone géographique (Rogier *et al.*, 1999 ; Rogier, 2003). Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Elle protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence et enfin en réduisant la durée et le niveau des infections par les stades sanguins (Deloron & Chougnat, 1992). Elle est labile et disparaît en 12 à 24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie ou chez la femme enceinte au 2ème et 3ème trimestre de la grossesse (Deloron *et al.*, 1992). Mais le développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents "réservoirs" parasitaires. Cette situation est rencontrée dans la plus grande partie de l'Afrique sub-saharienne.

2.2.4.2 Accès simple ou de primo-invasion

Les accès palustres primaires correspondent aux premiers cycles de développement endo-érythrocytaire du parasite. Chez les sujets non immuns, le délai après une piqûre infectante est classiquement de 11 jours, il peut osciller entre 9 et 30 jours. La symptomatologie reste le plus souvent atypique. La rupture des schizontes libère des toxines non protéiques, dont le GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) notamment (Schofield & Hackett, 1993) et le pigment malarique qui est pyrogène ; ceci provoque une réaction inflammatoire de l'organisme après stimulation de la production de TNF (Tumor Necrosis Factor) par les macrophages, et ainsi un accès de fièvre. Les accès de fièvre à 39-40°C interviennent de manière intermittente, tous les deux jours, ou peuvent être continus. On observe également des frissons, des sueurs, des céphalées, des myalgies, un malaise général, de l'anorexie et des troubles digestifs. On observe parfois une hépatomégalie et une splénomégalie. Les accès de primo-invasion sont rarement observés chez les nourrissons de moins de 6 mois qui présentent des parasitemies sans signe clinique (Kitua *et al.*, 1997). Un accès dû à *P. falciparum* peut à tout moment se transformer en accès grave surtout chez les enfants et les personnes adultes non immunes.

2.2.4.3 Accès sévère

Une parasitémie élevée semble être une composante nécessaire à la sévérité de l'accès palustre (White, 2004). Des mécanismes distincts caractérisent deux formes de complications pathologiques: l'anémie sévère et l'accès cérébral, appelé aussi accès pernicieux ou neuropaludisme. Ce dernier représente probablement la première cause d'encéphalopathie non traumatique dans le monde (Newton *et al.*, 2000) et est l'expression la plus fréquente du paludisme grave en zone d'endémie.

Dans les régions hyper-endémiques, où le nombre de piqûres infectantes par homme et par an dépasse la centaine, l'anémie sévère (définie comme une concentration d'hémoglobine < 5g/dl) est beaucoup plus fréquente que l'accès cérébral, bien que ses mécanismes physiopathologiques ne soient pas complètement compris. L'anémie, dans le cadre du paludisme, est causée à la fois par destruction des globules rouges infectés et non infectés et par une baisse de leur production (Pradhan, 2009). Une inadéquate réponse immunitaire dirigée contre les antigènes du parasite jouerait également un rôle dans la survenue de l'anémie sévère (Haldar & Mohandas, 2009). En effet, les anticorps produits contre les protéines de surface des merozoïtes, lors de la rupture des schizontes, peuvent moduler les fonctions du rein et des macrophages et entraîner par la même occasion une exacerbation de l'anémie. Elle touche surtout les femmes enceintes et les jeunes enfants (Ekwall, 2003). Il existe peu de stratégies de lutte contre l'anémie sévère. La plus utilisée est la transfusion sanguine qui, elle-même, peut être responsable d'autres infections (comme le VIH) surtout en zone d'endémie (Ekwall, 2003). Bien qu'une parasitémie élevée soit nécessaire, la densité parasitaire ne peut pas présager du risque de décès par anémie (Kitua *et al.*, 1997).

2.2.4.4 Traitement du paludisme, chimio-prévention et résistance aux antipaludiques

Une fois le diagnostic réalisé, il s'avère important de mettre en place un bon traitement pour soulager le malade. L'objectif principal du traitement antipaludique est d'obtenir une guérison clinique et parasitologique (suppression de la présence du *Plasmodium*) rapide. L'objectif secondaire est de prévenir (i) la survenue des formes graves du paludisme, (ii) les échecs de traitements liés à une mauvaise utilisation du médicament (iii) l'apparition d'une résistance aux antipaludiques. Les CTA (Combinaison Thérapeutiques à base de l'Artémisinine) représentent le traitement recommandé pour tous les cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*. Les sels de quinine sont aussi utilisés pour les formes graves de la maladie (WHO, 2005 ; WHO, 2009 ; WHO, 2010 ; PNLP Bénin, 2011).

La maladie peut être prévenue au moyen d'antipaludiques. Les voyageurs peuvent se protéger

au moyen d'une chimioprophylaxie qui supprime le stade sanguin de l'infection palustre, ce qui empêche le développement de la forme clinique de la maladie. L'OMS recommande en outre le traitement préventif intermittent par la sulfadoxine-pyriméthamine pour les femmes enceintes vivant dans des zones de forte transmission, à chaque visite prénatale programmée après le premier trimestre. De même, pour les nourrissons vivant dans des zones de forte transmission d'Afrique, 3 doses de sulfadoxine-pyriméthamine en traitement préventif intermittent sont recommandées en même temps que les vaccinations systématiques. En 2012, l'OMS a recommandé la chimioprévention saisonnière du paludisme comme stratégie complémentaire de prévention antipaludique pour le Sahel. Cette stratégie prévoit l'administration d'un traitement d'un mois d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine à tous les enfants de moins de 5 ans pendant la saison de forte transmission (WHO, 2012).

La résistance aux antipaludiques est un problème récurrent. La résistance de *P. falciparum* aux précédentes générations de médicaments comme la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) s'est généralisée au cours des années 1970 et 1980, sapant les efforts de lutte antipaludique et inversant la tendance des progrès accomplis en matière de survie de l'enfant. Ces dernières années, une résistance à l'artémisinine a été signalée dans quatre pays de la sous-région du Grand Mékong: le Cambodge, le Myanmar, la Thaïlande et le Viet Nam (WHO, 2013). Si de nombreux facteurs contribuent vraisemblablement à l'apparition et à la propagation d'une résistance, le recours à l'artémisinine utilisée seule par voie orale apparaît comme une cause importante. Lorsqu'ils sont traités avec une monothérapie à base d'artémisinine, les patients peuvent être tentés d'interrompre trop vite leur traitement dès que les symptômes ont disparu. Mais ils ne sont alors que partiellement guéris et des parasites persistent dans leur sang. Sans l'administration d'un second médicament en association (comme avec la CTA), ces parasites résistants survivent et peuvent être transmis à un moustique et à une autre personne. Si la résistance à l'artémisinine progresse et gagne d'autres régions géographiques étendues, les conséquences pour la santé publique pourraient être très graves, car aucun autre antipaludique de remplacement ne sera disponible avant au moins cinq ans (WHO, 2013).

L'OMS préconise une surveillance systématique de la résistance aux médicaments antipaludiques et aide les pays à renforcer leurs efforts dans ce domaine de recherche important. Des recommandations plus complètes figurent dans le Plan mondial de l'OMS pour endiguer la résistance à l'artémisinine (*Global Plan for Artemisinin Resistance Containment*) lancé en 2011 (WHO, 2013).

2.2.4.5 Anophèles vecteurs du paludisme et quelques éléments de leur bio-écologie

Les moustiques appartenant à la sous-famille des Anophelinae (Diptera: Culicidae) et tous regroupés dans le genre *Anopheles* constituent les vecteurs du paludisme. On dénombre environ 450 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine sont capables de transmettre des plasmodes à l'homme (Mouchet *et al.*, 2004). Dans la pratique, 20 espèces assurent l'essentiel de la transmission dans le monde. Les autres ne participent pas à la transmission soit parce qu'elles piquent de préférence les animaux, soit parce qu'elles sont réfractaires à une ou plusieurs espèces (ou souches) de *Plasmodium*. Chaque espèce d'anophage occupe une aire géographique particulière (Figure 7) (Sinka *et al.*, 2012). La distribution géographique des anophèles vecteurs présente des similitudes avec la répartition des échantillons de pluie annuelle à travers l'Afrique (Coetzee *et al.*, 2000). Cependant, on ne trouve aucune espèce d'anophage à une altitude supérieure à 2000 m d'altitude.

Les anophèles sont des insectes holométaboles dont le cycle de développement est marqué par une phase pré-imaginale aquatique (œufs, larves, nymphes) et une phase adulte (imago). La durée de développement larvaire est très variable. *An. gambiae* s.l. accomplit son développement larvaire en moins de 10 jours en milieu tropical dans les collections d'eau stagnantes, temporaires, peu profondes et ensoleillées, faiblement chargées en matières organiques et où la température de l'eau dépasse 30°C. La femelle n'est fécondée qu'une fois dans sa vie, mais les mâles peuvent féconder plusieurs femelles (Craig, 1967). Le cycle de maturation des ovocytes qui débute avec le repas de sang et se termine avec la ponte est dénommé cycle gonotrophique.

En Afrique tropicale, une douzaine d'espèces seulement, mais redoutables par leur efficacité vectorielle, est concernée : celles du complexe *An. gambiae* (*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* principalement) et l'espèce *An. funestus* (Figure 7) assurent la majeure partie de la transmission, *An. nili* et *An. moucheti* jouant aussi un rôle important dans certaines régions (Mouchet *et al.*, 2004). Ces espèces sont connues pour leur grande capacité vectrice, ce qui explique en partie la forte endémicité palustre en Afrique (Mouchet *et al.*, 2004).

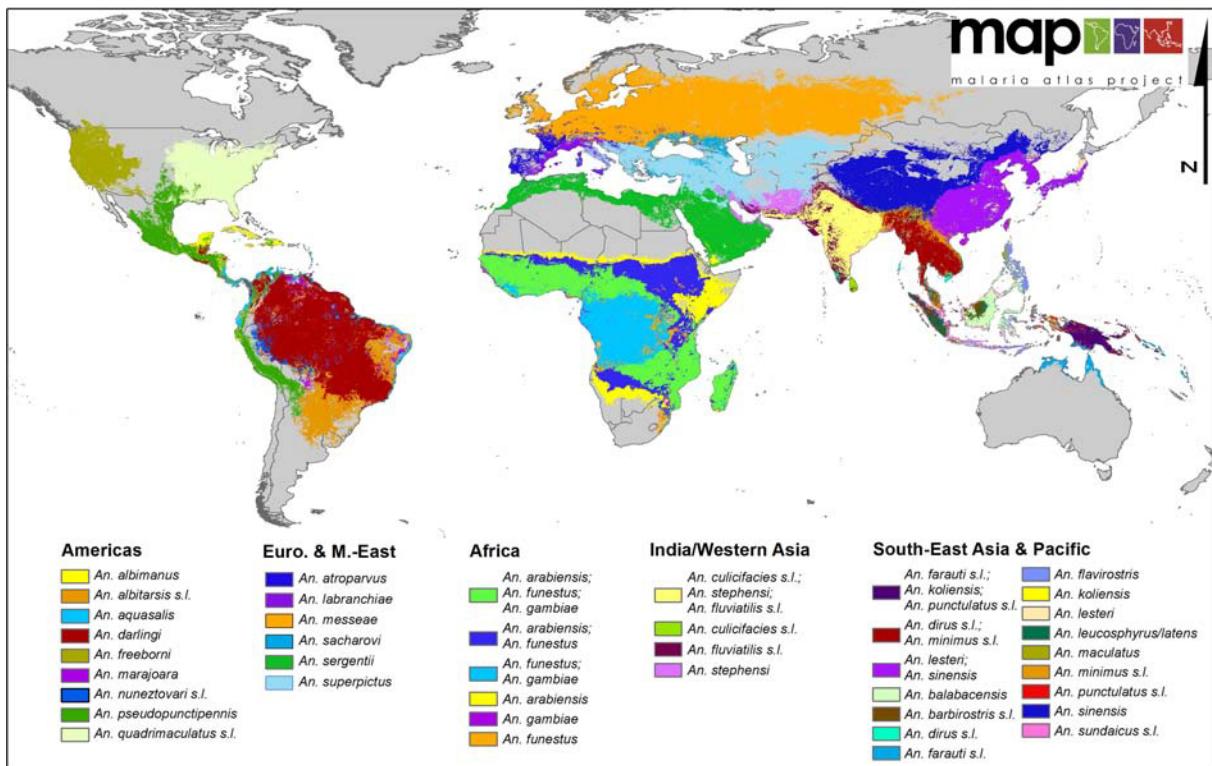


Figure 7 : Distribution globale des vecteurs principaux et secondaires du paludisme dans le monde (Sinka *et al.*, 2012)

Le complexe *An. gambiae* s.l. (*sensu lato*) présente en Afrique, 7 espèces dont *An. gambiae* s.s. (*sensu stricto*) et *An. arabiensis* sont les plus importantes en terme de distribution géographique et de capacité vectorielle. Ces deux espèces présentent, en Afrique, des limites de distribution qui semblent être déterminées par les conditions climatiques (Mouchet *et al.*, 2004). *An. gambiae* s.s. occupe les zones de forêt mais remonte loin dans les savanes humides jusqu'à la limite de la ceinture sahélienne pré-désertique. *An. arabiensis* est présente au Sahel et sur les plateaux d'Afrique méridionale. Il s'enfonce assez profondément dans les savanes humides, englobant la zone de répartition d'*An. gambiae* s.s. (Mouchet *et al.*, 2004). La zone de recouvrement de ces deux espèces est d'ailleurs assez large. Les femelles de ces deux espèces piquent généralement à l'intérieur des maisons, on dit qu'elles sont endophages. Mais l'exophagie, la faculté de prendre leurs repas sanguins hors des domestiques, n'est pas rare, en particulier chez *An. arabiensis*. On peut aussi rencontrer des comportements intermédiaires entre l'endophagie et l'exophagie chez ces deux espèces. Ces deux espèces sont nettement anthropophiles (Duchemin *et al.*, 2001), sauf si l'abondance de bétail à proximité favorise la zoophilie (Diatta *et al.*, 1998). Le comportement endophile/exophile est variable selon la

saison, les préférences trophiques, l'habitat, l'anthropophilie etc. *An. gambiae* s.s. a été reconnu comme composé de plusieurs formes chromosomiques (5 en Afrique de l'Ouest : les formes Forêt, Savane, Bissau, Mopti et Bamako) (Toure *et al.*, 1983 ; Coluzzi *et al.*, 1985). La prévalence de ces formes répond essentiellement aux variations climatiques (Toure *et al.*, 1998 ; Bayoh *et al.*, 2001). Le développement d'outils moléculaires d'identification a permis de définir deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (della Torre *et al.*, 2001) qui correspondent respectivement aux formes chromosomiques Mopti et Savane (Favia *et al.*, 1997). Les formes moléculaires M et S présentent des préférences écologiques différentes. Les flux de gène semblent limiter entre les formes moléculaires M et S qui présentent de différentes sensibilités aux différents insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes (Diabate *et al.*, 2002; Diabate *et al.*, 2004). Les formes moléculaires M et S sont devenues respectivement *An. coluzzii* et *An. gambiae* (Coetzee *et al.*, 2013).

L'espèce *An. funestus* est répandue dans toute l'Afrique sub-saharienne sauf dans les parties très sèches du Sud, du Nord et de l'Est du continent. Toutefois, elle est très localisée dans les grandes forêts du Centre. Comme *An. gambiae* et *An. arabiensis*, elle montre une tendance anthropophile, mais un certain opportunisme tend à augmenter la zoophilie (lorsqu'il y a abondance de bétail sensible par exemple). L'endophagie et l'endophilie sont aussi très marquées chez *An. funestus*. Il est de ce fait un vecteur principal du paludisme en Afrique après *An. gambiae* et *An. arabiensis*. *An. funestus*, qui a besoin d'ombre pour se développer, pullule au niveau des marais à végétation dressée et au niveau des rizières et est abondant en fin de saison des pluies et au début de saison sèche où il peut alors prendre le relais d'*An. gambiae*. Il peut être associé à un paludisme stable ou instable suivant le contexte épidémiologique (Mouchet *et al.*, 2004).

An. nili est très largement répandue dans toute l'Afrique et est localisé aux environs des cours d'eau permanents ou semi-permanents dans lesquels se développent ses larves. Cette espèce pique volontiers l'Homme. L'activité de piqûre se manifeste assez rapidement après la tombée de la nuit et présente un pic plus précoce que ceux (entre 0h et 5h) d'*An. gambiae* et d'*An. funestus*, mais *An. nili* est nettement plus exophage et exophile que ces deux derniers (Mouchet *et al.*, 2004).

An. moucheti, quant à lui, est limité au bloc forestier d'Afrique centrale et aux galeries forestières qui le prolongent au nord et surtout au sud. Les adultes sont très anthropophiles, surtout que la présence du bétail est très rare en forêt. Ils sont également très endophiles. Ils restent dans les maisons des villages riverains et peuvent faire des trajets de 3 km entre le village et le lieu de ponte (Mouchet *et al.*, 2004).

2.3 Méthodes de lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle est l'une des composantes majeures de la lutte contre le paludisme. C'est un outil complémentaire à la prise en charge des accès palustres, pour réduire la morbidité et la mortalité. D'une manière générale, la diminution de la capacité vectorielle peut être envisagée par différentes stratégies de lutte, généralement classées selon le facteur de transmission qu'elles touchent. Elle permet la prévention et la lutte contre les épidémies, l'élimination de nouveaux foyers dans les zones indemnes de paludisme, le contrôle de la transmission dans les zones à risques élevés, la réduction de la transmission dans les zones de fortes résistances aux antipaludiques et la lutte contre le paludisme en zone endémique (OMS, 2002). En effet, certaines méthodes ont pour objectif de réduire la densité de moustiques ou la longévité des femelles adultes tandis que d'autres visent à réduire le contact homme-vecteur. Mais le choix de l'une ou l'autre doit tenir compte de la bio-écologie des espèces visées, de leur comportement et du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission de la maladie (OMS, 2002).

2.3.1 Lutte contre les larves

La plupart des méthodes de lutte visant à réduire la production de moustiques nécessitent le traitement des gîtes larvaires. Néanmoins, une lutte anti-larvaire bénéfique au plan épidémiologique contre le paludisme implique une réduction quasi totale des gîtes à anophèles, principalement dans les zones de paludisme stable où la transmission peut être assurée par un petit nombre de vecteurs. Or les caractéristiques des gîtes larvaires des espèces vectrices *An. gambiae* et *An. arabiensis* (nombreux et temporaires) ne permettent pas l'utilisation des méthodes de lutte anti-larvaire quelles qu'elles soient (aménagement de l'environnement, lutte biologique, lutte chimique). Néanmoins de rares exemples de contrôle efficace utilisant des poissons larvivores culiciphages (*Gambusia affinis* et *Poecilia reticulata*) ont été observés dans des zones de paludisme instables, où les gîtes larvaires étaient limités et facilement repérables (Louis et Albert, 1988). La lutte antilarvaire par l'utilisation des biolarvicides en combinaison avec les intra ou extra domiciliaires a refait surface au cours de ces dernières années avec l'utilisation des bactéries et dont les plus utilisées sont pour le contrôle biologique des moustiques, se trouvent les productrices des spores, comme le *Bacillus sphaericus* et le *Bacillus thuringiensis israelensis*. Ces bactéries détruisent les larves des moustiques de façon spécifique, sans affecter la santé humaine, ni celle des autres organismes vivants. A partir de ces bactéries, des larvicides ont été mis au point et utilisés dans la lutte contre les différentes maladies comme le paludisme, la dengue et

la fièvre jaune (Glare *et al.*, 2005 ; Fansiri *et al.*, 2006., Fillinger *et al.*, 2006)

2.3.2 Lutte contre les adultes

La pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations est un moyen très efficace pour réduire rapidement la transmission du paludisme. Pour obtenir un résultat optimal, il faut pulvériser au moins 80% des habitations dans les zones ciblées. Cette pulvérisation est efficace pendant 3 à 6 mois en fonction du type d'insecticide utilisé et du type de surface pulvérisée. Le DDT peut être efficace pendant 9 à 12 mois dans certains cas. Des insecticides à effet rémanent plus long sont actuellement en cours d'élaboration de même que de nouvelles classes de produits destinés aux programmes de pulvérisation (WHO, 2013). Cette technique est encore utilisée en Afrique pour lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An. funestus* et *An. gambiae*. La Pulvérisation Intra Domiciliaire (PID) est l'un des principaux outils de lutte antivectorielle contre le paludisme utilisé actuellement. Gahan ; 1944 a eu le mérite d'avoir réalisé aux Etats-Unis, dans la vallée du Mississippi les premiers traitements intradomiciliaires par le DDT. Les résultats obtenus étaient spectaculaires (Mouchet, 1994). La technique s'est développée, avec le même succès en Europe méditerranéenne, au Venezuela puis, finalement, dans le monde entier (Coz *et al.*, 1968 ; Mouchet, 1994). Utilisé en aspersions intra domiciliaires à la dose de 2g/m², le DDT fut l'arme de choc de la stratégie d'éradication (Mouchet, 1994; Coleman *et al.*, 2008), mais il a été rapidement abandonné du fait de son effet毒ique et des énormes dommages causés à l'environnement. L'OMS recommande la pulvérisation intra domiciliaire d'insecticides à effet rémanent dans des zones de transmission faible à modérée comme méthode de lutte antivectorielle. L'application de la PID a été soigneusement standardisée et des spécifications très claires existent sur le matériel et les insecticides (OMS, 2006). Elles sont particulièrement conseillées pour la prévention des épidémies à la suite de signaux d'alarmes telles que les fortes pluies, la migration des sujets non-immuns et l'augmentation des températures minimales. Cette stratégie de lutte vise la réduction des densités de moustiques agressifs et de la longévité des femelles. Les traitements intradomiciliaires présentent cependant l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages et/ou exophiles (i.e. *An. arabiensis*), qui continuent de prendre des repas sanguins, assurant ainsi un niveau minimal de transmission.

2.3.3 Réduction du contact homme-vecteur

Les moustiquaires à imprégnation durable (MID) sont celles qui sont les plus fréquemment distribuées dans les programmes de santé publique. L'OMS recommande une couverture universelle de la lutte antivectorielle dans la plupart des régions. Le moyen le plus efficace et le moins coûteux d'y parvenir est de fournir des moustiquaires à imprégnation durable de façon à ce que chacun puisse dormir toutes les nuits sous une telle moustiquaire (WHO, 2005). Cette stratégie vise à établir une barrière (physique et/ou chimique) entre l'homme et le moustique. Les moustiquaires sont utilisées depuis longtemps pour se protéger des piqûres de moustiques (Snow *et al.*, 1987). Leur efficacité s'est vue renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticides (Darriet *et al.*, 1984), ajoutant à la barrière physique, un effet répulsif et létal. En effet, l'effet répulsif des pyréthrinoïdes empêche le moustique de se gorger au travers de la moustiquaire et d'y pénétrer lorsque celles-ci sont trouées après un certain temps d'utilisation. L'effet létal sur les moustiques contribue quant à lui à la protection communautaire conférée par les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). En effet, avec une couverture de la population supérieure à 80%, elles entraînent une diminution de la transmission palustre («effet de masse») en réduisant la densité vectorielle, la durée de vie du moustique ainsi que les indices sporozoïtiques (Lengeler, 2004). Cependant, pour que les moustiquaires puissent être acceptées par les communautés, il est indispensable qu'elles protègent efficacement contre les autres insectes nuisibles tels que les Culex, les poux, les punaises ou les blattes (Mouchet *et al.*, 2004), que leur prix soit accessible à l'ensemble de la population, et qu'il n'y ait pas besoin de ré-imprégnier la moustiquaire (Lines, 1996). C'est pourquoi, depuis quelques années, des moustiquaires imprégnées d'insecticides à «longue durée d'action» (Long Lasting Insecticide Nets: LLIN) sont disponibles sur le marché et présentent l'avantage de ne nécessiter aucun retraitement durant la durée de vie de la moustiquaire, estimée à 4 ou 5 ans (Guillet *et al.*, 2001a). D'autres moyens de prévention du paludisme sont utilisés tels que les serpentins, les bombes d'aérosol, les raquettes, les feuilles, etc.

2.4 Résistance de *Anopheles gambiae s.l* aux insecticides

Une grande partie des succès obtenus jusqu'ici contre le paludisme est due à la lutte antivectorielle, largement tributaire de l'emploi de pyréthrinoïdes, qui sont la seule catégorie d'insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires imprégnées d'insecticides et des moustiquaires à imprégnation durable. Ces dernières années, une résistance aux pyréthrinoïdes a fait son apparition dans de nombreux pays. Dans certaines zones, on a

déTECTé une résistance aux quatre classes d'insecticides utilisées en santé publique. Cette résistance n'a que rarement été associée à une baisse de l'efficacité, et les moustiquaires à imprégnation durable et la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent restent des moyens très efficaces dans presque toutes les situations.

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec des cibles biologiques présentes chez l'espèce. Plusieurs étapes sont nécessaires avant que l'insecticide n'exerce son action. Il doit d'abord entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans son organisme, être transformé dans certains cas en métabolite actif, puis transporté jusqu'à la cible. Chacune de ces étapes est sous le contrôle d'un ou de plusieurs gènes. Tout mécanisme qui modifie l'une de ces étapes peut conduire donc à une résistance (Soderlund & Bloomquist, 1990). La résistance peut impliquer un comportement d'évitement de l'insecte qui ne rentre plus en contact avec l'insecticide (résistance comportementale), une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, une modification des voies métaboliques ou enfin une modification de sa cible. La résistance comportementale et les modifications de l'absorption ou de l'excrétion des insecticides sont des phénomènes rares et dont la contribution réelle à la résistance est souvent difficile à mettre en évidence. En revanche, les fortes résistances sont associées à des mécanismes métaboliques et des modifications de cible.

2.4.1 Mécanismes de résistance

Trois termes sont employés pour décrire les patrons de résistance des insectes aux insecticides: **résistance croisée**, **résistance multiple** et **résistance multiplicative** (Nikou, 2003). Quand un(e) gène/mutation est responsable de la résistance à plusieurs familles d'insecticides, on parle de **résistance croisée**. Un tel phénomène s'observe généralement entre des molécules ayant le même site d'action. Par exemple, les organophosphorés et les carbamates ont des cibles et des modes d'actions relativement similaires et la résistance à une famille entraîne souvent une résistance à l'autre. La résistance croisée désigne également la résistance à plusieurs insecticides avec des modes d'action différents mais qui sont métabolisés par les mêmes enzymes (Lepoivre, 2003). La **résistance multiple** est la résistance conférée par plusieurs mécanismes de résistances chez un insecte. Par exemple, un insecte possédant deux mutations distinctes qui le rendent résistant à deux familles d'insecticides avec des modes d'action différents (Perera *et al.*, 2008). Enfin, la **résistance multiplicative** désigne le fait que le niveau de résistance conféré par plusieurs mécanismes de résistances aux insecticides chez un insecte sera plus élevé que la somme des niveaux de résistance conférée par ces mêmes mécanismes isolés (Hardstone *et al.*, 2009). Autrement dit,

les mécanismes de résistances peuvent agir en synergie. Plusieurs types de mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides ont été identifiés. Ils peuvent être soit comportementaux, soit liés à des modifications physiologiques (cuticulaire et métabolique) ou bien liés à la mutation de la protéine cible de l'insecticide (Figure 8). Cependant ces mécanismes ne semblent pas être les seuls impliqués dans la résistance des insectes aux insecticides et d'autres restent à étudier.

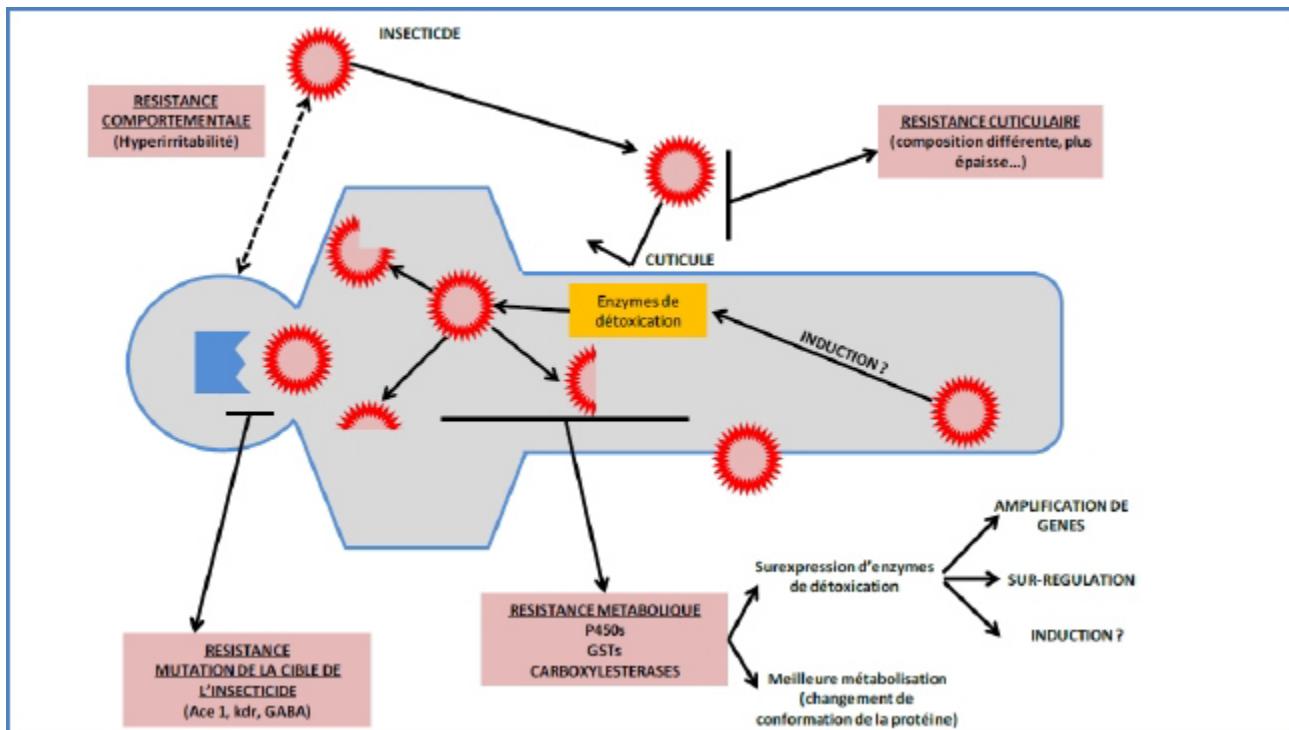


Figure 8 : Principaux mécanismes de résistances aux insecticides chimiques chez les insectes
(Source : Poupardin, 2011).

2.4.1.1 Résistance comportementale

La résistance comportementale repose sur une modification du comportement de l'insecte lui permettant d'éviter un contact avec la molécule d'insecticide. La résistance comportementale est moins bien connue que les autres mécanismes de résistance.

2.4.1.2 Résistance métabolique

La résistance métabolique est le mécanisme le plus commun chez les insectes en général. Ce mécanisme repose sur les systèmes enzymatiques que tous les insectes possèdent pour assurer la détoxication naturelle des éléments étrangers. Chez les moustiques, trois catégories

d'enzymes interviennent dans cette fonction, à savoir les carboxylestérases (COEs), les monooxygénases à cytochromes P450 (CYPs) et les glutathion-S-transférases (GSTs) (Hemingway *et al.*, 2004). Ces enzymes sont surproduites par les moustiques résistants par rapport aux moustiques sensibles et leur permettent de métaboliser ou de dégrader les molécules d'insecticide avant qu'elles n'exercent un effet toxique sur leur cible. La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme (Rooker *et al.*, 1996) ou à une augmentation du nombre de copies des gènes qui codent ces enzymes (Wirth *et al.*, 1990 ; Devonshire *et al.*, 1991).

2.4.1.3 Résistance physiologique

C'est une modification du métabolisme représentée en majorité par l'augmentation de la dégradation de l'insecticide et/ou une modification de la cible.

- *Modification de la cible*

Le type de mécanisme de résistance communément trouvé chez les insectes est la modification de la cible de l'insecticide. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux : l'acétylcholinestérase (AChE), le canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) et le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les mutations au niveau de la cible sont des mécanismes de résistance très efficaces qui s'accompagnent de phénomènes de résistance croisée pour tous les insecticides agissant sur la même cible.

Les CNaVdp interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Les pyréthrinoïdes et le DDT agissent au niveau des CNaVdp et perturbent le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses.

Une mutation ponctuelle remplaçant une leucine par une phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant le CNaVdp (mutation *kdr* Leu-Phe) confère la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT en Afrique de l'Ouest (Dong *et al.*, 1997). En Afrique de l'Est, c'est plutôt le remplacement de la leucine par une serine à la même position qui confère la résistance aux pyréthrinoïdes (mutation *kdr* Leu-Ser) (Ranson *et al.*, 2000 ; Verhaeghen *et al.*, 2006). Au Bénin, cette mutation est désormais présente dans les localités de Bohicon et de Malanville chez le même vecteur (Djègbè *et al.*, 2011). Il est important de noter qu'une nouvelle mutation *kdr* N1575Y (remplacement d'une Asparagine par la

Tyrosine) vient d'être identifiée dans les populations de *Anopheles gambiae* récoltées à Bohicon, Tori-Bossito et Houeyaho (Jones *et al.*, 2012).

Les organochlorés du groupe des cyclodiènes ont leur site d'action au niveau des récepteurs du GABA du système nerveux central. Une seule mutation ponctuelle sur des récepteurs GABA est responsable de la résistance aux cyclodiènes chez plusieurs espèces d'insectes. Tout comme dans le cas de l'AChE1, cette mutation entraîne une modification structurale du site d'action réduisant ainsi la fixation des cyclodiènes.

La cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme située dans les synapses des cellules nerveuses. Les insecticides des familles des carbamates et des organophosphorés agissent sur l'acétylcholinestérase en l'inhibant, ce qui entraîne la mort de l'insecte par accumulation de l'acétylcholine (substrat de l'enzyme) dans la fente synaptique. Plusieurs formes modifiées de cette enzyme (également appelées acétylcholinestérase insensible) ont présenté une affinité diminuée pour ces insecticides. La forme mutée retrouvée chez *An. gambiae*, principal vecteur du paludisme en Afrique intertropicale, résulte d'une mutation de la glycine en sérine en position 119 conférant une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés (Weill *et al.*, 2004).

- Détoxication accrue

La détoxication accrue est l'augmentation de l'activité des enzymes qui sont chargées de dégrader les substances toxiques. Il peut s'agir d'une modification de la structure de l'enzyme qui la rend plus efficace pour inactiver l'insecticide, mais plus généralement, c'est une augmentation de la quantité d'enzyme synthétisée par l'insecte qui est incriminée. Trois types d'enzymes peuvent intervenir dans la résistance. Ce sont les estérases, les transférases et les oxydases.

Estérases : Ces enzymes peuvent intervenir dans la résistance à une ou plusieurs familles d'insecticides. Chez *Culex quinquefasciatus*, elles sont principalement responsables de la résistance aux organophosphorés. Dans la plupart des cas, la résistance est due à une surproduction d'enzymes par les insectes résistants. Chez *Culex quinquefasciatus*, on connaît actuellement 8 estérases réparties en deux groupes A et B selon qu'elles hydrolysent préférentiellement l'alpha ou le bêta Naphtyl acétate utilisé pour leur mise en évidence (Wirth *et al.*, 1990). Les travaux menés sur l'estérase B1 ont pu montrer que cette enzyme pouvait atteindre jusqu'à 12% des protéines totales de l'insecte (Fournier *et al.*, 1987). Il a été démontré que cette production accrue d'estérase est le résultat d'une amplification génique (Mouchés *et al.*, 1986) : le gène qui le code est au moins 250 fois plus abondant chez les

insectes résistants que chez les insectes sensibles. Il est probable que l'amplification génique serait également le mécanisme responsable de la résistance chez *Culex quinquefasciatus*. Elles n'agissent pas par hydrolyse mais en séquestrant les organophosphorés vis-à-vis desquels elles possèdent une forte affinité (Cuany *et al.*, 1993).

Glutathion S Transférase: Elles permettent la conjugaison des insecticides avec la forme réduite du glutathion formant ainsi des métabolites moins toxiques. L'enzyme la plus importante de ce groupe est la DDT-ase dont la surproduction chez certains moustiques, confère une résistance au DDT (Grant & Matsumura, 1989; Prapanthadara *et al.*, 1995a&b).

Dégénération Oxydative: Les dégradations oxydatives sont catalysées par un système complexe d'enzymes membranaires dont la principale est le cytochrome P450 ou oxydase à fonction multiple (MFO). Ces enzymes interviennent dans la résistance aux pyréthrinoïdes et dans une moindre mesure aux autres insecticides (Soderlund & Bloomquist, 1990; Kumar *et al.*, 1996). Dans les souches résistantes, on observe généralement une surproduction de l'enzyme. On parle de résistance dès que ces réactions d'oxydation vis-à-vis des insecticides sont accélérées.

2.4.2 Impact de la résistance sur les programmes de lutte contre les vecteurs

La détection d'une résistance aux insecticides devrait donc être une composante essentielle de tous les efforts nationaux de lutte antipaludique, afin de garantir la mise en œuvre des méthodes de lutte antivectorielle les plus efficaces. Le choix d'un insecticide pour les pulvérisations à l'intérieur des habitations devrait toujours être une décision prise sur la base des données locales récentes concernant la sensibilité des vecteurs cibles (WHO, 2012).

L'efficacité d'une méthode de lutte contre les vecteurs du paludisme et notamment *An. gambiae* est généralement évaluée sur le plan entomologique, et ensuite d'un point de vue épidémiologique (Fegan *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, aucune étude épidémiologique n'a démontré une quelconque diminution de l'efficacité des moustiquaires imprégnées ou des aspersions intradomiciliaires due à ces mécanismes de résistance. Une étude récente réalisée dans des villages du nord de la Côte d'Ivoire avec des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine sur une population de *An. gambiae* fortement résistante aux pyréthrinoïdes (fréquence du *Kdr* d'environ 90%) a permis de réduire la prévalence des porteurs asymptomatiques de 12 % pour une protection contre le paludisme estimée à 56%, i.e. réduisant de plus de deux fois le nombre d'accès palustres chez les enfants de moins de 5 ans (Henry *et al.*, 2005). Cette protection s'est avérée comparable à celle conférée par des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine dans une région de Sierra Léone où les

populations anophéliennes étaient sensibles aux pyréthrinoïdes (Marbiah *et al.*, 1998). D'un point de vue entomologique, l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides, tant en zone sensible que résistante aux pyréthrinoïdes, a été beaucoup étudiée. Selon plusieurs auteurs (Chandre *et al.*, 2000; Corbel *et al.*, 2004), les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes, moins sensibles à l'effet irritant, resteraient plus longtemps sur la moustiquaire et absorberaient en conséquence par contact tarsal une dose d'insecticide plus importante, ce qui expliquerait des taux de mortalité sensiblement identiques entre moustiques sensibles et moustiques résistants (Darriet *et al.*, 1998, 2000). Néanmoins en 2004, une étude rapporte une diminution de la mortalité d'individus homozygotes résistants pour le *Kdr* en contact avec des tissus imprégnés de pyréthrinoïdes (Corbel *et al.*, 2004b). Plus récemment, une évaluation menée au Bénin a montré que l'efficacité de moustiquaires imprégnées de lambdacyhalothrine était considérablement réduite en zone de résistance (N'Guessan *et al.*, 2007). Les résultats ont en effet montré que la mortalité induite par les MII passait de 98% en zone sensible à 30% en zone résistante. Bien que ces résultats méritent d'être confirmés dans d'autres contextes entomologiques, la résistance aux pyréthrinoïdes pourrait s'avérer être un véritable obstacle au bon fonctionnement des programmes de lutte contre le paludisme basés sur l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes.

2.4.3 Stratégies de gestion de la résistance

L'Afrique subsaharienne et l'Inde caractérisées par de hauts niveaux de transmission et de nombreuses informations faisant état d'une résistance aux insecticides suscitent néanmoins de grandes préoccupations à cet égard. La mise au point d'insecticides nouveaux et différents est devenue prioritaire et plusieurs composés prometteurs sont actuellement testés. La mise au point de nouveaux insecticides pour l'imprégnation des moustiquaires est une priorité particulière (WHO, 2012). Les stratégies de gestion de la résistance visent à prévenir, retarder ou limiter le développement d'individus résistants au sein d'une population cible. Pour y parvenir, il est indispensable, d'une part, 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 l'évolution de la résistance sur le terrain. La dynamique de la résistance aux insecticides est un processus complexe qui dépend d'un certain nombre de facteurs biologiques, génétiques et opérationnels (Georghiou & Taylor, 1977; Georghiou, 1980). Les facteurs biologiques concernent directement le cycle de vie de l'insecte cible (nombre moyen de descendants,

durée moyenne des générations) ainsi que son écologie (structuration des populations, taux de migration).

Afin de garantir une riposte mondiale rapide et coordonnée face à la menace de résistance aux insecticides, l'OMS a collaboré avec un large éventail de partenaires et élaboré un plan mondial de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides (GPIRM), publié en mai 2012. Ce plan définit une stratégie en cinq volets appelant la communauté internationale à:

- planifier et mettre en œuvre des stratégies de gestion de la résistance aux insecticides dans les pays d'endémie palustre;
- assurer un suivi de la résistance et une surveillance entomologique appropriés et rapides ainsi qu'une gestion efficace des données;
- mettre au point des outils de lutte antivectorielle nouveaux et novateurs;
- combler les lacunes des connaissances concernant les mécanismes de la résistance aux insecticides et l'impact des méthodes de gestion actuelles de celle-ci; et
- vérifier que des mécanismes efficaces (sensibilisation et ressources financières) soient mis en place.

2.5 Méthodes d'évaluation de la lutte contre le paludisme

Les évaluations en phase 3 et 4 des moyens de lutte contre le paludisme dans les zones à risque ont abouti à une réduction du poids de la maladie dans certaines de ces zones (Greenwood & Targett, 2009; Takken & Knols, 2009) de telle sorte que l'objectif d'éradication, encore tabou il y a quelques années, revient sur le devant de la scène. Si la technologie et les moyens de lutte contre le paludisme ont connu des développements importants, des enseignements du programme d'éradication mené au milieu du vingtième siècle (années 50-70) ont peut-être été oubliés (Rogier *et al.*, 2009a). Quelle que soit la méthode de lutte, son efficacité doit être évaluée et surveillée de manière précise afin de savoir si elle permettra d'éliminer ou seulement de contrôler le paludisme dans les zones où elle sera appliquée systématiquement (Rogier *et al.*, 2009a). L'efficacité « théorique » (« efficacy » des anglais) ou l'efficacité « réelle » (« effectiveness » des anglais) d'une méthode de lutte est mesurée par son impact épidémiologique sur le paludisme chez l'homme ou/et par des paramètres entomologiques associés à la transmission et par l'estimation de son acceptabilité par les communautés cibles (Rogier *et al.*, 2009b).

2.5.1 Acceptabilité et surveillance des effets secondaires

L'acceptabilité d'une méthode de lutte contre les moustiques vecteurs du paludisme (MII_s, aspersions intra-domiciliaires, bombes aérosols, répulsifs, serpentins fumigènes....) facilite son utilisation par la population et de ce fait, est un facteur déterminant de son efficacité. Elle varie selon les bénéfices qu'en tire la population, le degré d'inconvénient causé, l'investissement en temps et en argent (Rogier *et al.*, 2009a). Son évaluation dès la mise en place de la lutte permet d'évaluer et d'améliorer l'efficacité de la méthode de lutte.

2.5.2 Evaluation entomologique de la lutte anti-vectorielle (LAV)

La morbidité et la mortalité dues au paludisme sont liées à la transmission des parasites par un vecteur infecté et donc à l'exposition des populations humaines aux piqûres des vecteurs infectés. L'évaluation entomologique de la lutte peut aider à comprendre et à expliquer les résultats des paramètres épidémiologiques (prévalence et densité parasitaires, taux d'incidence de la maladie, de morbidité et de mortalité...). Elle se fait par la détermination du niveau d'exposition aux piqûres et du taux d'infection plasmodiale des anophèles (la transmission des sporozoïtes).

2.5.2.1 Evaluation du risque d'exposition

Il a été montré qu'il existe une relation entre le degré d'exposition et la transmission de la maladie (Carnevale *et al.*, 1988). Même s'il n'y a pas de proportionnalité stricte entre l'abondance du vecteur et l'intensité de la transmission et entre le nombre de piqûres infectantes et la morbidité, l'échantillonnage des populations de vecteurs permet de caractériser leur abondance en fonction du lieu et de la période, et de caractériser de ce fait le risque spatio-temporel de paludisme. De plus, l'évaluation de la densité des populations adultes, donc du risque d'exposition aux piqûres, est la première démarche permettant de définir le risque de transmission (TIE = « Taux d'Inoculation Entomologique »). Cette étape d'échantillonnage entomologique est essentielle pour une meilleure définition des campagnes de surveillance et de contrôle effectives et sélectives des populations de vecteurs et pour évaluer l'efficacité de la LAV (Odiere *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, les moyens entomologiques évaluant l'exposition de l'homme aux différentes espèces d'anophèles sont : les captures par pièges (pièges lumineux, moustiquaires pièges, etc.), les captures sur « appât humains », l'imprégnation intra-domiciliaire d'insecticides pour l'étude de la faune résiduelle. La sélection des méthodes d'échantillonnage dépend de facteurs

de base comme le coût, la praticité et la reproductibilité, de l'objectif ainsi que le type d'insectes étudiés.

2.5.2.1.1 Captures sur appât humain

Elle consiste à capturer les femelles agressives qui essaient de se nourrir sur les humains. Elle permet de connaître les variations saisonnières et journalières, l'activité des vecteurs et de déterminer leur taux d'agressivité. Cette technique est particulièrement adaptée pour les espèces anthropophiles (Le Goff *et al.*, 1993) et représente donc la meilleure méthode d'échantillonnage pour évaluer les densités de vecteurs piquant l'Homme. On exprime alors la densité en nombre de piqûre/homme/nuit. Il existe une variabilité inter-hommes ; chaque personne est plus ou moins attractive. Cinq types de stimuli incitent une recherche de l'hôte par les moustiques : le dioxyde de carbone, l'odeur de l'hôte, stimuli visuel, la chaleur et la vapeur d'eau (McIver, 1982). Une irrégularité des captures peut également être observée dans le temps, les conditions climatiques peuvent agir sur le comportement des insectes. Pour des raisons éthiques, ces techniques peuvent être déconseillées ou non approuvées par les agences sanitaires (Rubio-Palis et Curtis, 1992; Sithiprasasna *et al.*, 2004). Cependant, les risques d'infection peuvent être évités, ou au moins réduits en faisant participer les populations locales qui ont acquis un certain statut immunitaire les rendant réfractaires à l'infection ou en leur donnant un traitement prophylactique.

2.5.2.1.2 Les pièges

Les pièges utilisés sont de plusieurs types ; les types « CDC » (« CDC minature light trap », Centre for Diseases Control, Atlanta, USA) et « CFG » (« counterflow geometric trap », American Biophysics Corp., USA) étant, actuellement, les plus fréquemment utilisés dans les suivis entomologiques à large échelle (Kline, 2006; Owino, 2010). D'autant plus qu'ils peuvent être associés à des produits naturels (lait caillé traditionnel africain par exemple) ou industriels (fromages et autres produits laitiers) qui augmentent leur pouvoir attractif des moustiques culicidés (Owino, 2010). Les méthodes de piégeage renseignent sur l'abondance des différentes espèces. Bien que très utilisées, ces méthodes ne permettent pas de déterminer certains paramètres tels que l'agressivité, l'endophagie/exophagie des insectes capturés. De nombreuses études ont évalué et comparé les différentes méthodes de piégeage (Le Goff *et al.*, 1993; Mathenge *et al.*, 2004, 2005). De nombreuses variations entre les pièges ont été observées et chaque méthode semble présenter des biais. Les méthodes seront donc choisies en fonction des objectifs et du meilleur rapport coût/efficacité.

2.5.2.1.3 Faune résiduelle

Elle consiste à recueillir le matin les insectes restés dans l'habitat par pulvérisation d'insecticide. Cette méthode renseigne préférentiellement sur les espèces endophiles. Les espèces récoltées sont identifiées morphologiquement et/ou par PCR (biologie moléculaire). Elles peuvent permettre l'étude de la transmission grâce à la détermination de leur indice sporozoïtique par ELISA anti-CSP (Circum-Sporozoitic Protein).

2.5.2.2 Evaluation du risque de transmission

Elle dépend tout d'abord de la présence d'anophèles compétents (bonne capacité vectorielle), de leur taux d'infection par *Plasmodium*, du nombre de piqûres reçues et des caractéristiques du contact Homme-Vecteur. L'exposition au vecteur infecté est généralement évaluée par la mesure du **taux d'inoculation entomologique** (TIE) qui correspond au nombre de piqûres infectantes que reçoit un homme pendant une période donnée (Nombre piqûres infectantes/Homme/unité de temps (an, mois ou jour). Il est obtenu à partir de la formule suivante :

h = m.a.s, dans laquelle :

m = nombre quotidien de piqûres

a = fréquence des piqûres.

m.a (nombre moyen de vecteurs piquant un homme en 24 heures) dépend essentiellement du nombre de gîtes larvaires potentiels, de la productivité en anophèles des gîtes et de l'exposition de l'homme.

s = indice sporozoïtique = Is (pourcentage d'anophèles présentant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires). **s** s'obtient directement par dissection des glandes salivaires pour visualiser la présence de sporozoïtes ou par test ELISA circumsporozoïtique.

Il n'existe pas de classification des zones endémiques à partir du TIE mais une relation étroite entre l'intensité de la transmission anophélienne et le taux d'endémicité a été constatée (Killeen *et al.*, 2000):

- hypo-endémicité : TIE < 10 piqûres infectantes/homme/an
- méso-endémicité : 10 < TIE < 50 piqûres infectantes/homme/an
- hyper-endémicité : 50 < TIE < 100 piqûres infectantes/homme/an
- holo-endémicité : TIE > 100 piqûres infectantes/homme/an

La mesure du nombre de piqûres infectantes dans un site donné est la seule façon d'évaluer directement le risque de transmission du paludisme. Elle peut donc servir à mesurer l'efficacité des stratégies de LAV visant à rompre la transmission. Car, elle permet de

quantifier le degré d'infection d'une population de moustiques par *Plasmodium* et leur capacité à transmettre ces *Plasmodium* à l'Homme (Shaukat *et al.*, 2010). Différentes études ont montré une grande variabilité des valeurs du TIE à travers l'Afrique. Le TIE peut atteindre une valeur de 1000 dans les régions holo-endémiques et peut être inférieur à 1 dans des pays hypo-endémiques sahélo-soudaniens ou dans des contextes urbains. Entre ces extrêmes, on trouve des zones de paludisme saisonnier instable comme dans la majeure partie de l'Asie et de l'Amérique latine, où ces taux se situent au-dessous de 10, et souvent autour de 1 ou 2, et des zones de paludisme stable mais à recrudescence saisonnière, rencontrées dans la majeure partie de l'Afrique de l'ouest où ce taux se situe entre 10 et 100. La mesure du TIE est cependant confrontée à plusieurs biais du fait de la non standardisation des protocoles et des méthodologies utilisés (Githeko *et al.*, 1996; Kelly-Hope & McKenzie, 2009). Le TIE est une moyenne calculée à partir d'un échantillon de « captureurs » et de moustiques capturés. Cependant, plusieurs différences de comportement de piqûres des moustiques existent. Ces différences sont dues à des facteurs tels que l'attractivité individuelle, l'âge, le type de l'habitat des individus, la proximité de gîtes larvaires... Par exemple, les femmes enceintes et les porteurs de gamétocytes augmentent la capacité d'attirer les anophèles (Lindsay & Thomas, 2000 ; Lacroix *et al.*, 2005). Il a été aussi démontré que les adultes attirent plus les moustiques que les enfants (Carnevale *et al.*, 1978). La mesure du TIE doit être envisagée en fonction de la répartition des piqûres dans l'année et entre les différentes années (Smith *et al.*, 2005). En effet, suivant les modalités de transmission, les anophèles peuvent être présents régulièrement au cours de l'année (paludisme stable) ou bien concentrés à certaines périodes, comme la saison des pluies par exemple (paludisme instable).

De plus, la mesure du TIE manque de précisions du fait de l'hétérogénéité remarquable de la distribution des anophèles et de la faiblesse des indices sporozoïtiques (maximum 5%) même en zone de très forte endémicité (Drakeley *et al.*, 2003; Mbogo *et al.*, 1995); sa détermination est presque impossible dans les zones de faible transmission du fait de la faiblesse des densités de moustiques capturés (Corran *et al.*, 2007). Elle est aussi confrontée à des limites pratiques et éthiques car étant basée sur les captures sur hommes adultes difficilement extrapolables aux enfants (Smith *et al.*, 2005) et des piégeages qui sont souvent limités dans leur sensibilité et la reproductibilité des résultats qu'ils donnent. Dans un contexte urbain, où les hôtes humains prédominent, il est préférable d'utiliser une technique de capture sur appât humain, la forte disponibilité en hôtes pourrait « détourner » les anophèles des pièges lumineux. La relation entre TIE et la morbidité n'est pas clairement établie (Smith *et al.*, 2001), le rapport entre le taux d'inoculation entomologique et la prévalence du paludisme est

toutefois complexe et dépend de la nature de l'immunité contre le paludisme, de l'acquisition et de la perte de cette dernière et de la disponibilité ou non d'un traitement médicamenteux efficace.

2.5.2.3 L'analyse du repas sanguin

En complément à l'échantillonnage, l'analyse du repas sanguin des vecteurs permet de déterminer l'origine de l'hôte sur lequel l'insecte s'est nourri. Elle peut se faire par ELISA directe (Beier, 1998). Cette technique consiste à détecter dans le sang absorbé par les femelles anophèles des anticorps spécifiques d'un certain nombre d'hôtes potentiels (homme, bœuf, mouton, poule, cheval, porc...).

2.5.3 Evaluation de l'impact épidémiologique de la lutte

L'impact épidémiologique sur la maladie, et éventuellement sur l'infection, est le premier objectif des différentes mesures de lutte, qu'elles soient dirigées contre le vecteur ou le parasite. Son évaluation concerne les aspects parasitologiques et cliniques du paludisme humain : on parle d'indicateurs parasito-cliniques.

2.5.3.1 Critères cliniques

2.5.3.1.1 Indice splénique ou indice de Hackett

Dans les zones où le paludisme est la principale cause de la splénomégalie (zones de forte endémie palustre), la palpation de la rate peut être utilisée comme une méthode rapide et simple pour évaluer l'importance du paludisme dans la population. En effet, l'infection plasmodiale s'accompagne généralement d'une augmentation de la taille de la rate. On définit ainsi un indice splénique (IS) qui est la proportion d'enfants âgés de 2 à 9 ans porteurs de splénomégalie (Mouchet *et al.*, 2004).

L'indice de Hackett ou splénomégalie moyenne est la moyenne des classes de splénomégalie (classes 0 à 5 ; 0 = absence de splénomégalie) calculée en faisant la somme des produits des nombres d'enfants palpés par le numéro de leur classe de splénomégalie et en la divisant par le nombre d'enfants palpés. Ces indices ont l'avantage **(i)** d'être sensibles aux variations du niveau de transmission et à toutes les interventions antipaludiques, **(ii)** d'être estimés facilement, rapidement et à faible coût.

Cependant, un problème de reproductibilité des estimations données par ces indices se pose souvent, du fait de la difficulté de standardiser l'examen des enfants. De plus, un problème de spécificité se pose car les causes responsables des splénomégalies en zone d'endémie sont

souvent nombreuses (les bilharzioses par exemple). De ce fait, l'indice splénique perd son intérêt dans les études épidémiologiques et dans l'évaluation du poids du paludisme.

2.5.3.1.2 La morbidité palustre

L'évaluation, par la morbidité, du poids du paludisme et de l'efficacité de la LAV est basée sur le diagnostic clinique (incidence clinique du paludisme, un critère de référence OMS). Il n'existe cependant pas de signe pathognomonique du paludisme et les signes et symptômes sont de peu d'utilité dans le diagnostic de paludisme clinique (Genton *et al.*, 1994). Les accès de fièvre, l'anémie, les signes de gravité comme le coma ou les détresses respiratoires ne peuvent être aisément attribués à une infection plasmodiale dans les populations qui sont infectées la plupart du temps. L'attribution de ces manifestations cliniques au paludisme est problématique (manque de spécificité des signes cliniques) dans les populations exposées régulièrement à la transmission des plasmodes humains.

L'acquisition d'une immunité de prémunition et le portage asymptomatique de parasites sont très fréquents en zone d'endémie et constituent aussi un obstacle à l'évaluation de la morbidité palustre.

L'association positive entre la densité parasitaire et le risque de fièvre ne permet d'estimer qu'imparfairement la fraction des accès cliniques attribuables au paludisme. Cela a des conséquences importantes pour mesurer le poids du paludisme dans les populations et peut être un obstacle pour évaluer et mettre au point les mesures de lutte, surtout celles à des visées prophylactiques (médicaments, vaccins, protections antivectorielles).

2.5.3.1.3 La mortalité palustre

Comme pour la morbidité, l'estimation de la mortalité palustre directe n'est pas aisée (Molineaux, 1997). Il est le plus souvent difficile d'attribuer correctement un décès à une cause unique (un décès est souvent lié à plusieurs causes). De plus, la plupart des cas de mortalité palustre en zone d'endémie (plus de 90% des cas) sont enregistrés en dehors des structures sanitaires (Taylor *et al.*, 2004). Parmi les signes cliniques, seules des rétinopathies détectables par l'examen du fond d'œil permettraient, en présence d'une parasitémie patente, d'attribuer correctement les manifestations neurologiques centrales au paludisme (Beare *et al.*, 2006). L'évaluation de la mortalité palustre, qu'elle soit directe ou indirecte, pose donc des problèmes difficiles à résoudre. Evaluer des interventions de lutte antipaludique par leur impact sur la mortalité générale n'est pas satisfaisante non plus à cause du manque de spécificité du critère d'évaluation.

2.5.3.2 Critères parasitologiques : les infections plasmodiales

Sur le plan parasitologique, l'évaluation épidémiologique de la lutte contre le paludisme se fait par l'estimation de la prévalence, de l'intensité (densité), la multiplicité ou de l'incidence des infections plasmodiales. De nombreuses méthodes biologiques de détection des infections plasmodiales, première étape de l'estimation de l'impact de la lutte sur le plan parasitologique, sont utilisées (voir **partie 2.3 de ce même chapitre**). La plupart de ces méthodes de diagnostic permettent, à des degrés divers (dépendant surtout de la sensibilité de la méthode utilisée), d'estimer les paramètres épidémiologiques du paludisme que sont :

2.5.3.2.1 La prévalence des infections plasmodiales

Cette méthode consiste à déterminer l'indice plasmodique (I.P.) qui est la proportion (en %) d'enfants de 2-9 ans porteurs du parasite dans une population donnée et en un moment donné. La prévalence des infections plasmodiales est sensible à de nombreux facteurs. Elle augmente avec le niveau d'exposition à la transmission des plasmodes, le niveau de résistance des plasmodes aux médicaments antipaludiques et pendant la grossesse (Diagne *et al.*, 2000) et diminue avec l'augmentation du niveau d'immunité et l'utilisation d'antipaludiques efficaces. Lorsque le taux de prévalence est élevé, l'IP perd son pouvoir discriminant et ne rend plus compte des variations de niveau de transmission (Smith *et al.*, 2005), le taux de prévalence parasitaire perd donc son intérêt par rapport à la densité parasitaire moyenne ou à la multiplicité des infections. Lorsque le niveau de transmission est faible, il est alors laborieux d'estimer le taux de prévalence parasitaire (à cause des densités parasitaires basses) et de mettre en évidence les infections plasmodiales dans une petite proportion de la population humaine. L'évaluation de la prévalence plasmodiale devient alors un indicateur moins fiable dans l'évaluation de l'intensité de la transmission (Beier *et al.*, 1999; Hay *et al.*, 2008). Dans ces contextes, les variations spatiales et temporelles des estimations des prévalences plasmodiales peuvent être importantes et les infections mixtes de *Plasmodium* sont souvent sous-estimées. L'utilisation de tests de diagnostic rapide (TDR) permettrait de s'affranchir des contraintes de la microscopie mais leur faible sensibilité limite leur intérêt. De plus, l'estimation de la prévalence des infections plasmodiales dépend de la sensibilité de la méthode de détection utilisée surtout en zone de faible endémie et chez les individus les plus immuns.

2.5.3.2.2 La densité parasitaire

L'estimation de la densité parasitaire, c'est-à-dire la quantité de parasites dans le sang, a une importance épidémiologique et clinique. Elle constitue la méthode référence OMS pour évaluer l'efficacité de la lutte antipaludique et donc de la LAV. Les densités parasitaires peuvent être analysées par classes, de préférence avec une progression géométrique des parasitémies. Elles peuvent aussi être analysées par leur moyenne. On utilise généralement la moyenne géométrique afin de lisser les forts écarts individuels souvent fréquents en zone de forte endémicité palustre. Ces moyennes peuvent être calculées sur les seuls individus ayant une parasitémie positive. On peut aussi estimer la moyenne géométrique des densités parasitaires en incluant les parasitémies nulles. Pour cela, on utilise la transformation $\log.(x + 1)$ à la place de la transformation $\log.(x)$ de la densité parasitaire x . La densité parasitaire dépend de l'espèce plasmodiale (en moyenne les parasitémies les plus élevées s'observent avec *P. falciparum* et les moins élevées avec *P. malariae*) et est sensible à de nombreux facteurs. Comme pour la prévalence, elle augmente avec le niveau de transmission, le niveau de résistance des plasmodes et pendant la grossesse ou le post-partum (Diagne *et al.*, 2000) et diminue avec l'augmentation du niveau d'immunité, l'utilisation d'antipaludiques efficaces et l'ancienneté de l'infection. Lorsque le niveau de transmission est faible, les densités parasitaires sont basses et il devient laborieux de les mettre en évidence. Comme pour la prévalence, l'estimation des densités parasitaires dépend de la sensibilité de la méthode de détection utilisée, surtout en zone de faible endémie.

2.5.3.2.3 L'incidence des infections plasmodiales

L'incidence des infections plasmodiales, le nombre de nouvelles infections pendant une période de temps donnée, peut être estimée directement. Il s'agit en pratique de dénombrer les parasitémies patentées, *i.e.* détectables, chez des patients présentant des symptômes évocateurs de paludisme et recrutés dans les structures sanitaires où ils sont consultés (détection passive des cas) ou chez eux (détection active des cas). Dans le cadre du programme d'éradication du paludisme, les nouvelles infections sont recherchées activement chez les patients et chez leurs proches. Si la population étudiée a une immunité anti-plasmodiale, même parcellaire, cette approche aboutit à une sous-estimation de l'incidence des infections. Les nourrissons nés en zone d'endémie sont souvent considérés comme non immuns. Ils peuvent cependant avoir été exposés à des antigènes plasmodiaux ou à des plasmodes ayant traversé la barrière foeto-placentaire au cours de leur vie foetale (Dent *et al.*, 2006) ou à la naissance (infection congénitale). L'estimation du taux d'incidence des infections plasmodiales pose donc des

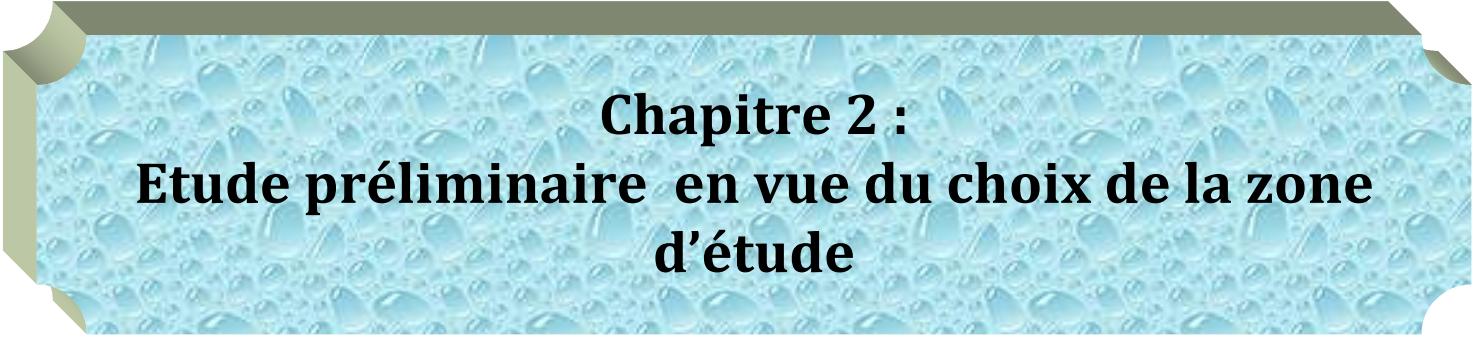
problèmes méthodologiques liés à la sensibilité des méthodes de détection parasitaire et des conditions de validité des modèles utilisés. En pratique, elle a rarement été utilisée pour l'évaluation épidémiologique du paludisme ou de l'efficacité de méthodes de lutte dans les zones de faible transmission.

2.5.3.3 Analyses des données séro-épidémiologiques

La sérologie a un intérêt particulier pour évaluer rétrospectivement l'exposition au paludisme. Les réponses anticorps spécifiques aux antigènes du *Plasmodium* durent plus longtemps que les infections plasmodiales qui les provoquent. De ce fait, dans les situations de faible endémie, les marqueurs sérologiques sont plus sensibles et semblent être moins affectés par la saisonnalité de la transmission que les paramètres parasitologiques (Robert *et al.*, 2006 ; Kelly-Hope and McKenzie, 2009). Ils peuvent donc constituer un outil robuste pour évaluer l'efficacité des stratégies de lutte antipaludique (et donc de la LAV) et utilisable pour la surveillance du risque de transmission des plasmodes même dans les régions qui sont en phase pré-éliminatoire du paludisme (Cook *et al.*, 2010). De plus, la recherche des anticorps anti-plasmodiaux est moins laborieuse que celle des infections plasmodiales dans ces zones de faible transmission (Corran *et al.*, 2007). Des réponses IgG contre des antigènes des stades merozoïte et sporozoïte ont été proposées comme des marqueurs sérologiques de la transmission, permettant ainsi de différencier des foyers avec une forte ou faible exposition au paludisme (hétérogénéité du risque de transmission), de distinguer une dynamique de transmission en fonction de la saison et d'évaluer l'efficacité de stratégies de lutte antipaludique (Webster *et al.*, 1992 ; Ramasamy *et al.*, 1994; Corran *et al.*, 2007; Baragatti *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2010).

Ces méthodes sont, comme les indicateurs parasitaires, applicables aux études longitudinales ou transversales. Mais elles sont difficilement applicables chez les enfants exposés du fait d'un faible niveau de réponses Ac (très faible titre Ac) (Ramasamy *et al.*, 1994). De plus, il existe des différences importantes liées **1)** à la durée de la persistance des réponses anticorps patentées après une infection plasmodiale et **2)** à la transmission transplacentaire des immunoglobulines G (IgG) de la mère à l'enfant et de la persistance de ces IgG maternelles chez l'enfant plusieurs mois après la naissance. De ce fait, les études séro-épidémiologiques reposant sur la détection des IgG et visant à apprécier le niveau d'exposition au paludisme ne devraient pas être menées chez les nourrissons (âge < 1 an).

De récents travaux ont montré l'utilisation des bio-marqueurs efficaces anti-salivaires spécifiques chez des individus pour évaluer leur exposition aux piqûres des moustiques (Remoue *et al.*, 2006 ; Poisignon *et al.*, 2008 ; Drame *et al.*, 2010 ; Drame *et al.*, 2012).



Chapitre 2 :
Etude préliminaire en vue du choix de la zone
d'étude

Microdistribution de la résistance de *An. gambiae* à la deltaméthrine dans le département du Plateau

L'intervention majeure de la lutte anti-vectorielle au Bénin est l'accès universel aux Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MILD) à tous les ménages. Or le principal problème de l'utilisation des matériaux imprégnés est l'apparition de la résistance. Ces dernières années, la résistance aux insecticides s'est largement répandue en Afrique de l'Ouest (Yadouléton *et al.*, 2010), en Afrique de l'Est (Stump *et al.*, 2004), du Centre (Etang *et al.*, 2006) et du Sud (Hargreaves *et al.*, 2000 et 2003). Face à la résistance des anophèles aux pyréthrinoïdes, le risque de baisse d'efficacité des interventions des programmes de lutte contre le paludisme n'est pas à exclure. Les travaux de N'guessan *et al.* (2007) ont montré une baisse d'efficacité des MIILD imprégnées à la lambdacyalothrine en cases expérimentales en zone de forte résistance des vecteurs aux insecticides au sud du Bénin. Pour évaluer l'efficacité des MIILD en zone de résistance des vecteurs aux insecticides, l'idéal est de disposer de localités où les vecteurs sont sensibles aux insecticides à comparer avec d'autres où les vecteurs sont résistants. Les travaux de Yadouléton *et al.* (2010) réalisés dans 40 localités au Sud du Bénin ont montré que toute cette région est couverte par des populations d'*An. gambiae* résistantes aux insecticides. Ces auteurs n'ont observé que quelques localités de sensibilité d'*An. gambiae* aux pyréthrinoïdes dans les communes d'Ifangni et d'Adja-Ouère situées dans le département du Plateau. A défaut d'un minimum de zone de sensibilité franche pour mettre en œuvre notre étude, nous avons multiplié les prospections larvaires dans le département du Plateau pour rechercher, en plus des localités où *An. gambiae* est sensible aux insecticides, d'autres localités où la résistance est faible. Ainsi, nous avons envisagé de mettre en œuvre l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans deux zones, une de faible résistance que nous avons dénommée R+ et une zone de forte résistance dénommée R+++. En effet, d'avril à juillet 2011, nous avons effectué plusieurs missions de prospection larvaire dans quatre communes du département du Plateau (Ifangni, Sakété, Pobè, Kétou). Les résultats des tests de sensibilité réalisés sur les moustiques récoltés ont permis d'opérer le choix des villages R+ et R+++(Article 1).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs)

Arthur Sovi^{1*}, Innocent Djègbè², Lawal Soumanou¹, Filémon Tokponnon³, Virgile Gnanguenon¹, Roseric Azondékon⁴, Frédéric Oké-Agbo¹, Mariam Oké³, Alioun Adéchoubou³, Achille Massougbedji⁵, Vincent Corbel^{6,7} and Martin Akogbéto¹

1. Méthodes

1.1 Description de la zone d'étude

L'étude a été réalisée dans les communes d'Ifangni, de Sakété, de Pobè et de Kétou situées dans le département du Plateau (sud-est du Bénin). Ce département a une superficie de 3.264 km², pour une population totale de 407 116 habitants. Il est caractérisé par deux saisons pluvieuses (mars à juillet et septembre à novembre) et deux saisons sèches (décembre à mars et août à septembre). Dans ce département, il y a eu une distribution massive de MIILD en 2007 par les autorités nationales dans le cadre des activités de lutte contre le paludisme au Bénin.

1.1.1 Ifangni

La commune d'Ifangni a pour coordonnées géographiques Latitude 6° 40' 0" Nord Longitude 2° 43' 0" Est. Elle s'étend sur 242 km² et compte 71 606 habitants depuis le dernier recensement de la population (RGPH 2002). Elle est limitée au sud par la commune d'Adjarra, à l'Ouest par les communes d'Avrankou et de Sakété, au Nord par la commune de Sakété et à l'Est par la république fédérale du Nigéria. Cette commune a un relief peu

accidenté entaillé par de petites et moyennes dépressions aux pentes très peu marquées. Il y règne un climat de type guinéen. Les principales activités sont le commerce et l'agriculture.

1.1.2 Sakété

La commune de Sakété a pour coordonnées géographiques Latitude $6^{\circ} 44' 11''$ Nord Longitude $2^{\circ} 39' 29''$ Est. La Commune de Sakété est située au sud-Ouest du département du Plateau. Elle est limitée au Nord par la commune d'Adja-Ouèrè, au Sud par les Communes d'Avrankou et d'Akpro-Misséréte dans le département de l'Ouémé, à l'Est par la République Fédérale du Nigéria et la commune d'Ifangni et à l'Ouest par les Communes d'Adjohoun et de Bonou. Elle s'étend sur 432 km² et compte 70 604 habitants (RGPH, 2002). Le climat est de type guinéen. Les principales productions agricoles sont : le palmier à huile et les cultures vivrières.

1.1.3 Pobè

La commune de Pobè a pour coordonnées géographiques Latitude $6^{\circ} 58' 60''$ Nord et Longitude $2^{\circ} 39' 49''$ Est. Elle est limitée au Nord par la commune de Kétou, au Sud et à l'Ouest par la Commune d'Adja-Ouèrè et à l'Est par la république fédérale du Nigéria. Elle s'étend sur 400 km² et compte 82910 habitants (RGPH, 2002). Cette commune jouit d'un climat de type subéquatorial. Les précipitations atteignent 1100 à 1200 mm par an. L'activité principale dans la commune est l'agriculture basée sur les cultures vivrières.

1.1.4 Kétou

La commune de Kétou est située à l'extrême nord du département du Plateau entre les latitudes $7^{\circ}10'$ et $7^{\circ}41'17''$ Nord d'une part et les longitudes $2^{\circ} 24' 24''$ et $2^{\circ} 47' 40''$ Est d'autre part (IGN, 1963). Elle couvre une superficie de 1.775 Km² et compte 100499 habitants (RGPH, 2002). Elle est limitée au Nord par la commune de Savè, au Sud par la commune de Pobè, à l'Ouest par les communes de Ouinhi et de Zangnanado dans le département du Zou et à l'Est par la république fédérale du Nigéria. Le climat est de type tropical à régime pluviométrique bimodal. L'agriculture est très axée sur la production des cultures vivrières.

1.2 Collecte de larves d'anophèles et élevage de moustique

Dans chacune des quatre communes, des prospections de larves d'anophèles ont été réalisées de mai à juillet 2011. Les larves d'anophèles ont été prélevées dans des collections

d'eaux par la méthode du « dipping » qui consiste à capturer les larves de moustiques directement dans les gîtes larvaires productifs à l'aide d'une simple louche. Les larves collectées sur le terrain ont été transportées à l'insectarium du CREC puis élevées jusqu'à l'émergence des adultes. Les moustiques adultes ont été identifiés morphologiquement grâce aux clés de Gilles & de Meillon (1968) et seules les femelles d'*An. gambiae* ont été utilisées pour le test de sensibilité au laboratoire.

1.3 Tests de sensibilité des anophèles aux insecticides

Le principe du test est basé sur la mesure du temps de Knock-Down (KdT50= Temps nécessaire pour que 50% des moustiques testés soient assommés par l'insecticide) et de la mortalité des moustiques adultes exposés une (1) heure à des papiers imprégnés de deltaméthrine à la dose diagnostique de 0.05%. A l'aide d'un aspirateur à bouche, 4 lots de 25 moustiques femelles âgées de 2 à 5 jours ont été introduits dans 4 tubes (n=100) tapissés de papier filtre. Après une 1h d'observation, les moustiques ont été transférés dans des tubes d'exposition tapissés de papier imprégné de deltaméthrine. Pendant l'exposition, les moustiques assommés ont été dénombrés toutes les 10 minutes. Après la période d'exposition, les moustiques ont été transférés dans les tubes d'observation, nourris avec une solution de miel à 10% puis maintenus en observation pendant 24h. Un même nombre de moustiques introduits dans des tubes « non traités » ont fait office de contrôle. Au terme de cette période d'observation de 24H, le taux de mortalité a été calculé. Ces taux sont interprétés selon les critères recommandés par l'OMS (WHO, 1998). Ainsi, les catégories de mortalité considérées sont :

- Mortalité > 97% : population d'anophèle dite sensible.
- Mortalité 80 – 97 % : résistance suspectée dans la population.
- Mortalité < 80% : population d'anophèle dite résistante

Les moustiques morts et vivants (exposés et non exposés à la deltaméthrine) ont été conservés séparément à -20°C et ont servi plus tard aux tests moléculaires afin de diagnostiquer les points de mutations.

1.4 Cartographie de la résistance

Les coordonnées géographiques des villages où la récolte des larves est effectuée sont enregistrées par GPS puis, projetées sur une carte du département du Plateau. Les trois niveaux de sensibilité des anophèles aux insecticides selon les critères de l'OMS (WHO,

1998) (sensible, résistant et suspicion de résistance) sont illustrés sur une carte. Globalement, 56 villages sont cartographiés.

1.5 Analyses statistiques des données

Le calcul des taux de mortalité a été effectué à l'aide du logiciel informatique Excel. La comparaison des taux de mortalité entre les villages d'une même commune a été effectuée en utilisant le test de chi2 de comparaison des proportions. Les intervalles de confiance sont déterminés par le biais de la méthode binomiale exacte. Ces analyses sont effectuées avec le logiciel R-2.15.2 (R Development core Team, 2011).

2. Résultats

2.1 Taux de mortalité des vecteurs à la deltaméthrine

Au total, d'avril à juillet 2011, 119 villages ont été prospectés dans l'ensemble des quatre communes dont 56 ont été positifs aux gîtes de *An. gambiae*.

Les taux de mortalité obtenus après exposition des populations de *An. gambiae* à la deltaméthrine (0,05%) ont varié entre 20% et 100%.

A Ifangni, le taux de mortalité a varié de 20% à Gblo-gblo, Djègou-djègui et à 100% à Zihan. Sur 19 villages, *An. gambiae* a été trouvé sensible seulement dans 2 (Zihan et Ko-Aïdjèdo). Une suspicion de résistance a été notée dans 10 villages (tableau I).

A Sakété, *An. gambiae* n'a été retrouvé sensible dans aucun village. A Iwaï et Djohounkollé, une suspicion de résistance a été notée (tableau I).

Tableau I: Statut de la résistance à la deltaméthrine chez *An. gambiae* à Ifangni et Sakété

Communes	Villages	Effectif (N)	Nombre de morts	Mortalité (%)
Ifangni	Lokossa*	44	36	82 ^a
	Ko-dogba*	48	42	87 ^{ad}
	Zihan*	50	50	100
	Baoudjo	89	72	81 ^a
	Gbédji	88	68	77 ^a
	Igolo	22	17	77 ^a
	Araromi*	39	33	85 ^{ad}
	Itassouumba*	66	59	89 ^{ad}
	Ko-koumolou*	48	40	83 ^a
	Itakpako*	131	105	80 ^a
Sakété	Banigbé Centre	97	32	33 ^{bc}
	Tchaada	22	7	32 ^{bc}
	Daagbe*	40	33	82 ^a
	Akadja	123	62	50 ^b
	Gblo-gblo	45	9	20 ^c
	Ko-aïdjedo*	92	90	98 ^d
	Zoungodo*	62	52	84 ^a
	Djegoun-djègui	40	8	20 ^c
	Ketougbekon*	147	121	82 ^b
	Ilakofadjji	44	30	68 ^a
	Dagbao	45	33	73 ^a
	Itadjèbou	34	21	62 ^{abc}
	Djohounkollé*	73	59	81 ^a
	Igbo-abikou	65	25	38 ^b
	Igbola	38	19	50 ^{ab}
	Alabansa	30	12	40 ^{bc}
	Iwai*	43	37	86 ^a
	Ikemon	86	40	46 ^{bc}
	Idiagbola	40	17	43 ^{bc}
	Yoko Centre	40	30	75 ^a

Les taux de mortalité portant des lettres différentes dans une même commune sont statistiquement différents ($p<0,05$). Les villages portant un astérisque sont de faible résistance et ceux qui n'en portent pas, de forte résistance.

Au niveau de la commune de Pobè, la mortalité des moustiques *An. gambiae* a varié de 45% à Obanigbé et à 85% à Agbarou. *An. gambiae* s'est révélé résistant dans tous les villages à l'exception de Agbarou où, une suspicion de résistance a été observée (tableau II).

A Kétou, le plus faible taux de mortalité de *An. gambiae* (67%) est obtenu à Alakouta contre 97% à Idi. Sur un total de 16 villages évalués, une suspicion de résistance est notée dans 2 (Adjozounmè et Idi) alors que la résistance a été observée dans tous les autres villages (tableau II).

Tableau II: Statut de la résistance à la deltaméthrine chez *An. gambiae* à Pobè et Kétou

Communes	Villages	Effectif N)	Nombre de morts	Mortalité (%)
Pobè	Igbo-okpa	79	58	73 ^{ac}
	Okeita	101	78	77 ^{ac}
	Obanigbé	40	18	45 ^b
	Agbarou*	55	47	85 ^a
	Issaba	111	68	61 ^c
	Okoofi 2	54	24	44 ^b
	Illekpa	39	26	67 ^c
	Osoumou 2	48	34	71 ^c
	Osoumou 1	70	44	63 ^c
Kétou	Onigbolo	90	66	73 ^{ac}
	Alakouta	36	24	67 ^{abc}
	Okpometa	57	23	41 ^a
	Mowodani	52	31	60 ^{ab}
	Idena 2	179	81	45 ^a
	Kpankoun	70	37	53 ^{ab}
	Okéola	49	24	48 ^a
	Odokoto	95	51	54 ^{ab}
	Igui-olou	100	72	72 ^{bc}
	Adjozoume*	100	83	83 ^c
	Idena 3	80	39	49 ^a
	Oloumou	94	48	51 ^{ab}
	Kouhoudou	60	37	62 ^{ab}
	Obatedo	95	74	78 ^{bc}
	Atchoubi 1	100	77	77 ^{bc}
	Atchoubi 2	55	35	64 ^{bc}
	Idi*	31	30	97 ^d

Les taux de mortalité portant des lettres différentes dans une même commune sont statistiquement différents ($p<0,05$).

Les villages portant un astérisque sont de faible résistance et ceux qui n'en portent pas, de forte résistance.

Globalement, sur l'ensemble des 56 villages, *An. gambiae* est résistant à la deltaméthrine dans 39 villages répartis sur les quatre communes. Toutefois, On a noté une sensibilité chez

les moustiques *An. gambiae* dans 2 villages de la commune d’Ifangni. La résistance a été suspectée dans 15 villages (tableau I & II).

2.2 Cartographie de la résistance des moustiques vecteurs à la deltaméthrine

Les différents niveaux de résistance à la deltaméthrine observés selon les critères de l’OMS (WHO, 1998) dans les différents villages prospectés sont illustrés sur la figure 9. La carte montre une concentration de villages où *An. gambiae* est sensible ou suspecté de résistance dans la commune d’Ifangni. Dans les communes de Sakété, Pobè et Kétou, *An. gambiae* s’est montré résistant dans la grande majorité des villages.

Les coordonnées géographiques enregistrées ont permis de réaliser la carte montrant la répartition de ces villages en fonction de leur statut de résistance.

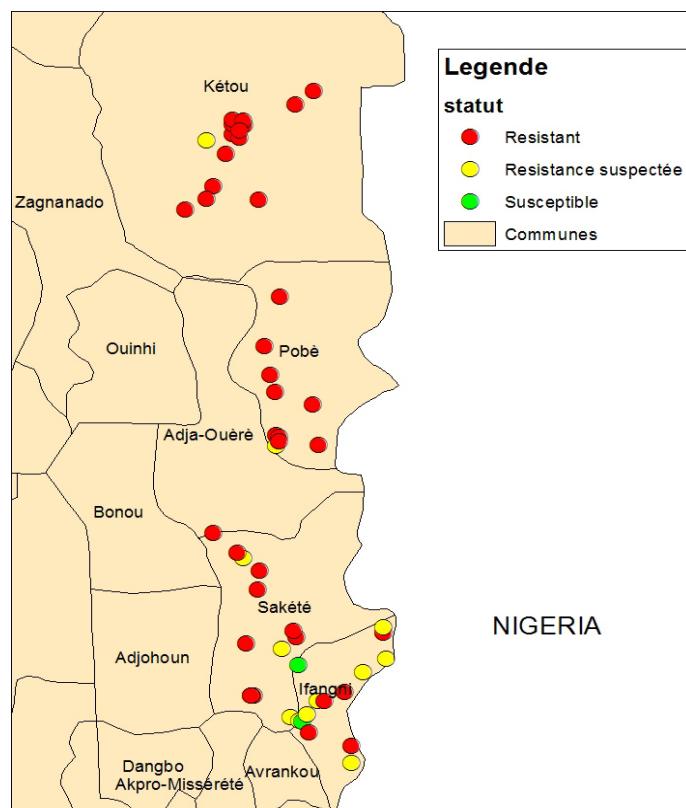


Figure 9 : Distribution de la résistance à la deltaméthrine chez *An. gambiae* dans les quatre communes du Plateau

2.3 Identification des zones R⁺ et R⁺⁺⁺ d’*An. gambiae* aux pyréthrinoïdes

A la suite de ces travaux portant sur les tests de sensibilité, nous avons décidé de considérer comme zone R⁺⁺⁺, l’ensemble des villages où le taux de mortalité des anophèles du milieu est

inférieur à 60%. Entre 80 et 100% de taux de mortalité, les villages sont considérés comme appartenant à une zone où la population des anophèles (*An. gambiae*) est faiblement résistante aux pyréthrinoïdes.

Globalement, sur l'ensemble des 56 villages, 16 sont R⁺ et, 40 R⁺⁺⁺. Pour considérer le même nombre de village R⁺ et R⁺⁺⁺, nous avons retenu les 16 R⁺ et nous avons choisi 16 autres pour le second groupe R⁺⁺⁺ en tenant compte des taux de mortalité les plus bas et de l'accessibilité géographique des villages pour équilibrer les deux groupes. Ainsi le tableau III présente la liste des villages identifiés pour abriter nos travaux.

Tableau III : Liste des 32 villages identifiés répartis selon le statut de résistance de *An. gambiae* à la deltaméthrine, année 2011

Zone de faible résistance [80%-100%]	Zone de forte résistance [0%-60%]
Itassoumba	Ikemon
Lokossa	Igbola
Itakpako	Banigbe centre
Ko-koumolou	Tchaada
Ko-aïdjedo	Idena2
Ketougbekon	Mowodani
Iwaï	Akadja
Djohounkolle	Okoofi 2
Zougoudo	Idena3
Ko-dogba	Igbo-abikou
Daagbe	Okeola
Zihan	Gblo-gblo
Araromi	Djegou-djegi
Agbarou	Okpometa
Adjozoume	Alabansa
Oloumou	Kpankoun

3. Discussion

Anopheles gambiae, principal vecteur du paludisme en Afrique, a développé une forte résistance vis-à-vis des insecticides au sud du Bénin. La résistance des populations d'*An. gambiae* aux pyréthrinoïdes pourrait être liée à l'utilisation massive de pesticides (pyréthrinoïdes) utilisés par les paysans ou les maraîchers pour contrôler les ravageurs des cultures. Les travaux de Akogbeto *et al.* (2005) confirment une large utilisation des pesticides

dans l'agriculture. Yadouleton & Akogbéto (2009) pensent que cette utilisation massive de pesticides dans le monde agricole serait due à la libéralisation du secteur d'intrant au Bénin.

Les travaux menés par Yadouléton *et al.* (2010) ont montré une large distribution de la résistance aux pyréthrinoïdes dans tout le sud du Bénin avec quelques poches de sensibilité des vecteurs. Pour cela, il était important pour nous de prospecter un grand nombre de villages afin de trouver des zones de sensibilité dans le département du Plateau. Pour cette raison, nous avons décidé de sillonnner un grand nombre de villages (119 localités) répartis sur 4 communes dans tout le département à la recherche des larves de *An. gambiae*. Les larves ont été récoltées même dans des villages très proches les uns des autres. Sur l'ensemble des 119 villages, seulement 56 sont retrouvés positifs en larves d'*An. gambiae*. Cette situation pourrait être liée au fait que, la plupart des villages de ce département ont un sol de plateau fait d'une épaisse couche sablo-argileuse qui favorise l'infiltration rapide de l'eau dans le sol après la pluie empêchant ainsi la formation des gîtes larvaires.

Les données obtenues lors de notre étude ont montré qu'*An. gambiae* est résistant à la deltaméthrine dans la plupart des 56 villages prospectés hormis Ko-aïdjedo et Zihan comme mentionné plus haut. Ces résultats confirment ceux de Padonou *et al.* (2012) qui ont montré une apparition de la résistance d'*An. gambiae* à la deltaméthrine dans le département de l'Ouémé et la rapide expansion de la résistance aux pyréthrinoïdes dans les populations naturelles d'*An. gambiae* en Afrique (Ranson *et al.*, 2011) et en particulier au Bénin (Corbel *et al.*, 2007 ; Djogbénou *et al.*, 2010 ; Djégbé *et al.*, 2011).

La plus part des villages sensibles sont retrouvés dans la commune de Ifangni. Ce statut de faible résistance de ces clusters à Ifangni serait probablement lié à la pratique du maraîchage sans utilisation d'insecticide. En effet, la non utilisation d'insecticide par les maraîchers est liée à la présence de nombreux bassins piscicoles à proximité des sites maraîchers. Les maraîchers évitent donc l'utilisation des insecticides afin de ne pas intoxiquer les nombreux poissons en élevage. La pression de sélection de gène de résistance sur les larves est donc faible. Il est à noter également que les maraîchers utilisent des engrains afin de fertiliser les terres dans le but d'assurer la croissance des cultures. Or, jusqu'à présent, même si des travaux récents effectués par Dadzé en 2009 (données non publiées) ont montré l'impact des engrains sur le développement larvaire, le taux de nymphose et d'émergence des moustiques, aucune étude n'a montré de façon nette, l'impact des fertilisants sur le développement de la résistance chez les moustiques *An. gambiae*. Dans les autres communes, les cultures des céréales des tubercules et même le coton sont observées. Ces types de cultures nécessitent l'utilisation des insecticides qui exercent une forte pression de sélection de la résistance. Les

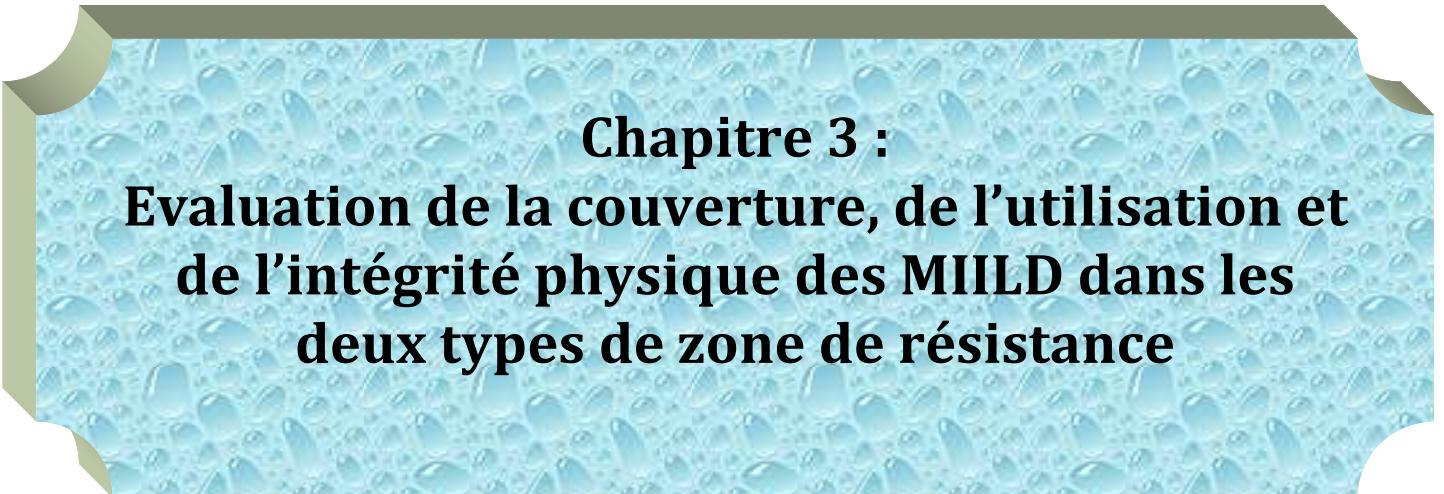
travaux effectués par Yadouléton *et al.* en 2011 ont montré que les zones de production cotonnière sont des zones où se développent par excellence une forte résistance aux insecticides au vu de leur forte utilisation afin de contrôler les nombreux ravageurs du coton. Les traitements insecticides qui s'effectuent durant la période de développement des larves de moustiques, projettent des particules de matières actives dont certaines entrent directement en contact avec les gîtes larvaires, et par conséquent avec les larves de moustiques qui s'y développent (Akogbéto *et al.*, 2005). Cette pression d'insecticide est forte car aucune larve n'y échappe. Il en est également de même pour les zones rizicoles (Dabiré *et al.*, 2007).

Cette étude préliminaire sur les niveaux de sensibilité des vecteurs aux insecticides dans les différents villages a permis de mettre en œuvre notre protocole d'évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle. A l'issue de notre étude, *An. gambiae* n'a été retrouvé sensible que dans 2 villages (Ko-Aidjèdo et Zihan). Or, selon notre protocole, nous avons besoin d'au moins 16 villages sensibles. Nous avons alors procédé à une classification des villages en 2 zones, l'une, R⁺⁺⁺, où le taux de mortalité (TM) de *An. gambiae* est inférieur à 80% puis, l'autre R⁺ avec un TM de *An. gambiae* au-delà de 80%. Toutefois, il faut reconnaître que ce type de classification présente des limites car les villages situés autour du seuil de 80% (soit légèrement en dessous, soit légèrement au-delà) constituent un groupe intermédiaire difficilement séparable de la zone R⁺ telle que définie ou de la zone R⁺⁺⁺. En effet, il n'y a probablement pas de différence significative entre les TM d'*An. gambiae* proches de la limite de 80% mais classés comme R⁺ ou R⁺⁺⁺. A Kétougèkon (village R⁺) par exemple, le TM d'*An. gambiae* est de 82% alors qu'à Okéita (village R⁺⁺⁺), il est de 77%. La différence n'est pas significative ($p=0,331$). La barrière est donc fragile entre certains moustiques classés faiblement résistants et certains classés fortement résistants.

4. Conclusion

De ces travaux, on note une large distribution de la résistance des vecteurs du paludisme à la deltaméthrine dans le département du Plateau. Seulement 2 villages de franche sensibilité sont retrouvés dans la commune d'Ifangni. Sur la base des critères de résistance que nous avons définis, plus de 70% des 56 villages prospectés sont R⁺⁺⁺. Cela confirme la pleine expansion de ce phénomène dans le département. Face à cette expansion, nous n'avons pas pu mettre en évidence le minimum de villages nécessaires pour une étude d'impact de la résistance sur l'efficacité des MIILD. Mais, malgré la fragilité de la classification des villages en R⁺ et R⁺⁺⁺, l'existence de villages de franche résistance (où le taux de mortalité d'*An. gambiae* < 60%) et de franche sensibilité (où le taux de mortalité d'*An. gambiae* > 90%) aurait été l'idéal pour la

mise en œuvre de l'étude. Par ailleurs, il serait aussi nécessaire de connaître la couverture et l'utilisation des MIILD par les populations dans les deux catégories de villages R⁺ et R⁺⁺⁺, d'où la pertinence du chapitre suivant.



Chapitre 3 :

**Evaluation de la couverture, de l'utilisation et
de l'intégrité physique des MIILD dans les
deux types de zone de résistance**

Plusieurs études dans les pays endémiques ont montré l'utilité des MIILD pour réduire le contact homme-vecteur (Greenwood *et al.*, 2005; Lengeler, 2005; Eisele *et al.*, 2006; Thwing *et al.*, 2008).

Le Bénin, à travers le Programme National de Lutte contre le Paludisme, a soutenu depuis 2000 l'initiative RBM et réalisé en Juillet 2011 une campagne de distribution universelle où environ 5 millions de moustiquaires ont été distribuées à la population. Cette distribution vise à augmenter de manière significative la couverture nationale en moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée (MIILD). Avant la distribution, la proportion de ménages possédant au moins une moustiquaire au niveau national était estimée à 52% (PNLP-AFRICARE BÉNIN-CRS BENIN, 2011). Après la distribution de Juillet 2011, cette proportion était de 86,4% (**Article 2**). De l'analyse du niveau d'atteinte de la couverture des ménages en MIILD dans les deux enquêtes, les facteurs associés de façon indépendante à la faible utilisation des MIILD étaient: l'âge, le degré d'usure des moustiquaires, la taille du ménage (moustiquaires/personne). Certaines études ont montré que plusieurs facteurs sont associés à la possession des MIILD et leur utilisation effective (Graves *et al.*, 2011). Ces facteurs seraient: les croyances culturelles, les pratiques des mécanismes de distribution des MIILD et la distance entre le point de distribution et les bénéficiaires, les rumeurs sur les MIILD et leur soutien social (Wiseman *et al.*, 2007; Baume *et al.*, 2007).

D'autres études menées au Bénin ont montré que plusieurs moustiquaires après 12 mois d'utilisation, sont trouées (Gnanguenon, communication personnelle). A partir de ces observations, des questions se posent: Est-ce que la population utilise effectivement les moustiquaires distribuées gratuitement? Ou bien, elles n'utilisent pas les MIILD à cause de leur nombre insuffisant ou de leur mauvais état physique?

Pour clarifier ces questions, nous avons mené une étude sur la couverture des moustiquaires imprégnées d'insecticide, leur utilisation et leur condition physique dans les zones R⁺ et R⁺⁺⁺, un an après la distribution. Cette étude a pour but de vérifier si le taux de couverture, le taux d'utilisation et l'état physique des moustiquaires sont similaires dans les deux zones R⁺ et R⁺⁺⁺. En effet, notre souhait est de comparer deux zones qui, globalement présentent les mêmes caractéristiques et qui ne diffèrent que sur le plan du statut de résistance (**Article 3**).

RESEARCH

Open Access

Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin

Filémon T Tokponnon^{1,2,3,4*}, Bruno Aholoukpe^{1,2}, Eric Y Denon^{1,2}, Virgile Gnanguenon^{2,3,4}, Alexis Bokossa², Raphael N'guessan⁵, Mariam Oke^{1,2}, Dorothée Kinde Gazard² and Martin C Akogbeto^{2,3,4}

academicJournals

Vol. 6(1), pp. 8-13, January 2014
DOI: 10.5897/JPHE2013.0590
ISSN 2006-9723 ©2014 Academic Journals
<http://www.academicjournals.org/JPHE>

Journal of Public Health and Epidemiology

Full Length Research Paper

Assessment of long-lasting insecticidal net coverage, use and physical integrity one year after universal distribution campaign in Plateau department in South-East Benin

Filémon T. Tokponnon^{1, 2,,5,6*}, Yolande Sissinto³, Aurore Hounto Ogouyémi³, Arthur Sovi^{5,6}, Virgile Gnanguenon^{5,6}, Adicath Adéola Adéothy³, Abel Wapo³, Bruno Aholoukpe^{1,2}, Patrick Makoutodé³, Alioun Adéchoubou¹, Ossè Razaki^{5,6}, Raphael N'guessan⁷, Dina Gbénou⁴, Mariam Oke^{1,2}, Dorothée Kinde Gazard², Achille Massougbedji³ and Martin C. Akogbéto⁵

1. Matériel et méthodes

1.1 Zone d'étude

Le choix du département de Plateau dans cette étude est fondé sur son accessibilité géographique, la forte utilisation de moustiquaires par les enfants de moins de 5ans. Les enquêtes entomologiques menées dans le département ont montré qu'il existe des zones de faible et de forte résistances aux pyréthrinoïdes (Yadouléton *et al.*, 2010). Selon le rapport général de la campagne de distribution, 85,5 % des ménages ont reçu une moustiquaire avec

une moyenne de 2,7 MIILD / ménage. 32 villages ont été choisis dans les quatre communes (figure 10).

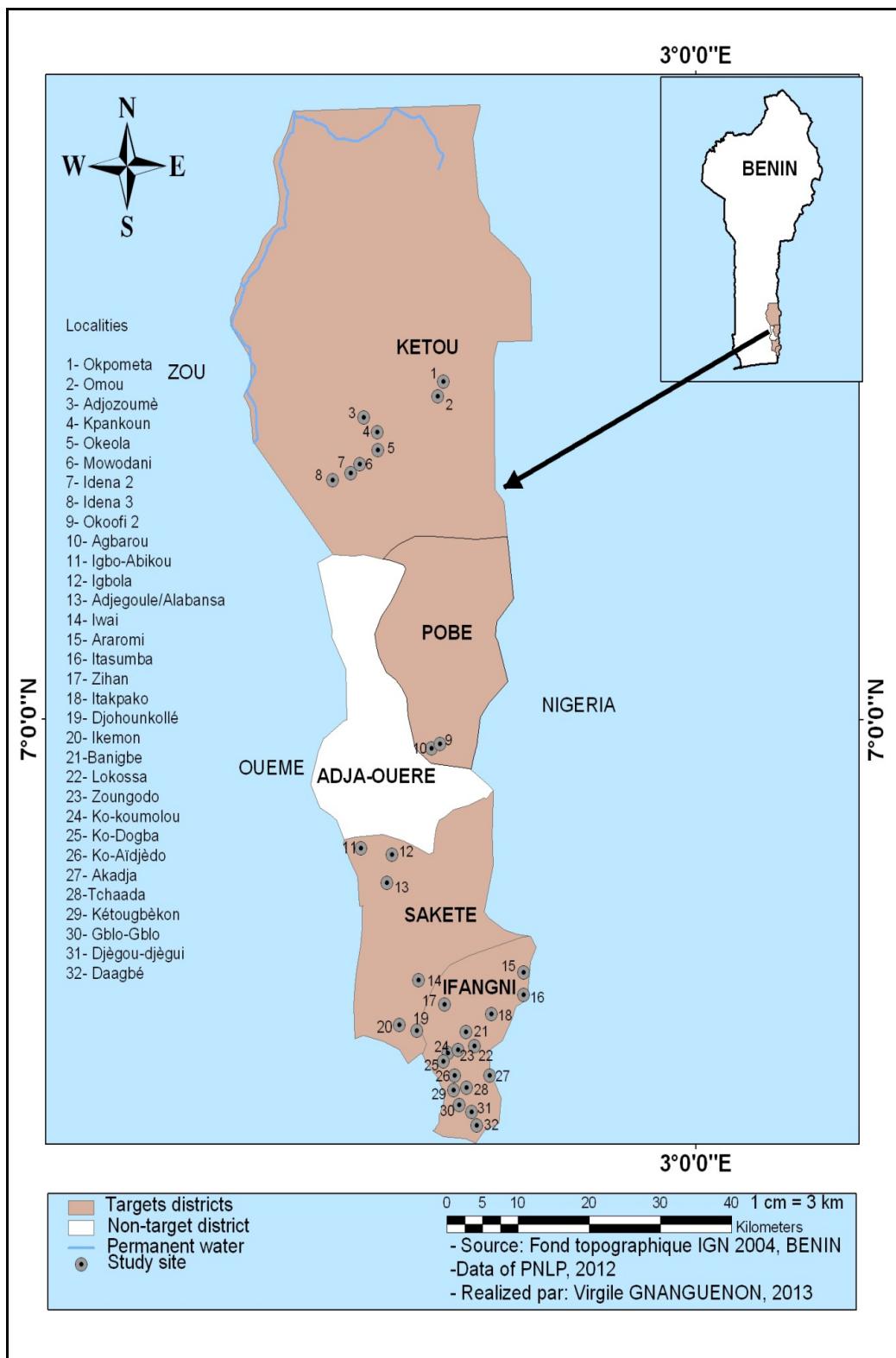


Figure 10: Villages cibles du département du Plateau (Benin)

1.2 Conception de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale, descriptive et analytique basée sur un questionnaire quantitatif et qualitatif qui a été effectuée dans 32 villages (cluster ou localité) dont 17 à Ifangni, 6 à Sakété, 2 à Pobè et 8 à Kétou de mai à août 2012. 30 ménages par cluster ont été choisis pour apprécier la disponibilité, l'utilisation et l'intégrité physique des moustiquaires. Les ménages ont été sélectionnés au hasard dans chaque localité. Avant de commencer l'enquête, une formation des enquêteurs suivie du pré-test des questionnaires a été effectuée. Sur le terrain, après l'approbation des chefs de villages, les enquêteurs sont retournés dans la communauté et un échantillonnage aléatoire des ménages de l'enquête en parcourant progressivement les maisons et en sautant à chaque fois une maison sur deux dans chaque village a été fait.

Le questionnaire a été administré aux hommes et femmes chefs de ménage après leur consentement. Le questionnaire a porté sur les connaissances, attitudes et pratiques des enquêtés relatives à la possession et à l'utilisation des MIILD. Les utilisateurs de MIILD sont ceux qui ont déclaré avoir dormi sous moustiquaire la nuit précédant l'enquête.

Les données sur les caractéristiques des moustiquaires, leur condition physique, la démographie des membres du ménage, d'autres caractères et les questions liées aux sources d'approvisionnement ont été posées à tous les ménages pour évaluer les origines des MIILD retrouvées. Les données ont été recueillies à l'aide d'une version adaptée des indicateurs standards de l'enquête sur le paludisme (RBM, 2012). La condition physique des moustiquaires a été estimée en utilisant l'un des deux indicateurs recommandés par l'OMS (OMS, 2011). Les principales catégories de trous dans les moustiquaires ont été enregistrées comme suit :

- T1 : trous de taille < pouce (0,5-2 cm);
- T2 : trous de taille > pouce < poing (2-10 cm);
- T3 : trous de taille > poing < tête (10-25 cm);
- T4 : trous de taille > tête (> 25 cm).

1.3 Analyses statistiques

Les enquêtes ont été réalisées à l'aide des questionnaires. A la fin de l'enquête, les données ont été recueillies avec Epidata et transférées dans le logiciel SPSS 16.0. La disponibilité des MIILD dans le ménage a été calculée comme une proportion de ménages ayant au moins une moustiquaire parmi l'ensemble des ménages interrogés. L'utilisation des MIILD a été estimée comme la proportion de ménages utilisant au moins une MIILD la veille de l'enquête selon la

disponibilité. Une fois que la possession et l'utilisation des MIILD ont été déterminées, les données ont été extraites dans un fichier Excel séparé pour MIILD appartenant aux ménages. Ensuite, les ménages utilisant moustiquaires ont été comparés à ceux qui n'ont pas utilisé afin d'identifier les facteurs associés au non utilisation des MIILD. Les obstacles liés à la non-utilisation des MIILD ont été déterminés en utilisant un modèle de régression logistique multivariée. Les données sur l'intégrité physique des moustiquaires et celles relatives aux origines des moustiquaires ont été extraites. Les différents trous observés ont été divisés en quatre et les fréquences ont été estimées pour évaluer l'état général de l'opération des MIILD (OMS, 2011 ; Kilian, 2012).

2. Résultats

2.1 Caractéristiques des ménages de l'étude

960 ménages (330 en zone R+, 390 en zone R+++ et 240 en zone Non déterminée) et 4688 personnes ont été inclus dans l'enquête et le taux de réponse a été de 100 % (tableau IV). 59,80% des chefs de ménages interrogés étaient des femmes contre 40,20% d'hommes. 68,23% des chefs de ménage étaient analphabètes, 19,58% ont un niveau primaire de scolarisation et 12,19 % ont un niveau secondaire de scolarisation. Sur les 4688 personnes enquêtées (tableau IV), 1339 (28,56%) ont moins de cinq ans, 800 (17,06%) ont été signalés être des femmes enceintes ou accouchées récentes et 2549 (54,37 %) étaient des personnes de plus de cinq ans (sans les femmes enceintes).

Tableau IV : Caractéristiques de base des ménages enquêtés en fonction des zones R⁺ et R⁺⁺⁺

Caractéristiques	Zone R+	Zone R+++	Total
Sexe des chefs de ménage (n=960)			
Homme	122 (31,61)	152 (39,38)	386 (40,20)
Femme	208 (36,24)	238 (41,46)	574 (59,80)
Niveau d'instruction des chefs de ménage			
Analphabète	218 (33,28)	266 (40,61)	655 (68,23)
Elémentaire	80 (42,55)	76 (40,43)	188 (19,58)
Post élémentaire	32 (27,35)	48 (41,03)	117 (12,19)
Taille du ménage (n=4688)			
Enfant moins de 5 ans	475 (35,47)	523 (39,05)	1339 (28,56)
Femmes enceintes	274 (34,25)	325 (40,63)	800 (17,06)
Personne plus de 5 ans	1207	1476	2549 (54,37)

2.2 Disponibilité des MIILD

Sur le total des ménages interrogés, 88,96 % avaient au moins une moustiquaire tandis que 11,04 % n'ont aucun type de moustiquaires. La majorité des ménages qui possèdent les MIILD ont une ou deux MIILD quelque soient la taille de leur ménage et le statut des deux types de zones (R+ et R++). 28,22% (25,47-31,16) avaient une MIILD, 31,85% (29,00-34,89) deux MIILD, 16,76% (14,54-19,27) trois moustiquaires et 12,18% (10,27-14,41) quatre MIILD et plus. Le nombre de moustiquaires imprégnées d'insecticide n'a pas varié significativement entre les zones de résistance ($p>0,05$) (tableau V). Le nombre moyen de MIILD appartenant aux ménages R+ était de 1,70 contre 1,82 dans les ménages R++ (tableau V). 87,19% (84,76-89,27) de ces moustiquaires proviennent de la campagne nationale de distribution de 2011, 9,1% (7,79-11,78) proviennent des femmes enceintes (MIILD reçus lors des consultations pré-natales) et 3,20% (2,21-4,61) ont achetés leur MIILD (figure 11).

Tableau V : Disponibilité des MIILD par cluster selon les statuts des clusters

Clusters	MIILD	Nombre de ménages	Moyenne	IC 95%
Okpometa (ND)	52	30	1,73	[1,40-2,05]
Oloumou (ND)	69	30	2,3	[2,03-2,56]
Okoofi 2 (ND)	73	30	2,43	[2,20-2,75]
Ikemon (ND)	52	30	1,73	[1,51-1,94]
Akadja (ND)	69	30	2,3	[2,08-2,51]
Djegou Djedji (ND)	65	30	2,17	[1,93-2,40]
Zougoudo (ND)	45	30	1,5	[1,09-1,90]
<i>Zone ND</i>	<i>425</i>	<i>210</i>	<i>2,02</i>	<i>[0,55-3,49]</i>
Kpankoun (R+)	59	30	1,97	[1,69-2,25]
Oke Ola (R+)	38	30	1,27	[1,02-1,52]
Idena2 (R+)	45	30	1,5	[1,11-1,88]
Igbola (R+)	54	30	1,8	[1,44-2,15]
Daagbe (R+)	49	30	1,63	[1,23-2,02]
Gblo Gblo (R+)	23	30	0,77	[0,43-1,10]
Ita Kpako (R+)	59	30	1,97	[1,62-2,32]
Itassumba (R+)	56	30	1,87	[1,54-2,19]
Ketougbekon (R+)	47	30	1,57	[1,24-1,90]
Ko-Aïdjedo (R+)	70	30	2,33	[2,12-2,54]
Lokossa (R+)	42	30	1,4	[1,00-1,79]
Zian (R+)	70	30	2,33	[1,98-2,67]
<i>Zone R+</i>	<i>612</i>	<i>360</i>	<i>1,70</i>	<i>[0,74-2,66]</i>
Mowodani (R+++)	74	30	2,47	[2,24-2,70]

Idena3 (R+++)	49	30	1,63	[1,24-2,01]
Adjozounme (R+++)	82	30	2,73	[2,54-2,92]
Agbarou (R+++)	44	30	1,47	[1,11-1,82]
Igboabikou (R+++)	39	30	1,3	[1,04-1,55]
Alabansa (R+++)	48	30	1,6	[1,22-1,97]
Iwai (R+++)	61	30	2,03	[1,68-2,37]
Djohounkolle (R+++)	53	30	1,77	[1,51-2,02]
Araromi (R+++)	40	30	1,33	[0,92-1,73]
Banigbe (R+++)	48	30	1,6	[1,28-1,91]
Ko Dogba (R+++)	56	30	1,87	[1,54-2,19]
Kokoumolou (R+++)	51	30	1,7	[1,42-1,97]
Tchaada (R+++)	64	30	2,13	[1,85-2,40]
Zone R+++	709	390	1,82	[0,84-2,80]
Total	1746	960	1,82	[1,76-1,87]

IC= intervalle de confiance; R+ : faible résistance ; R+++ : forte résistance ; ND non disponible

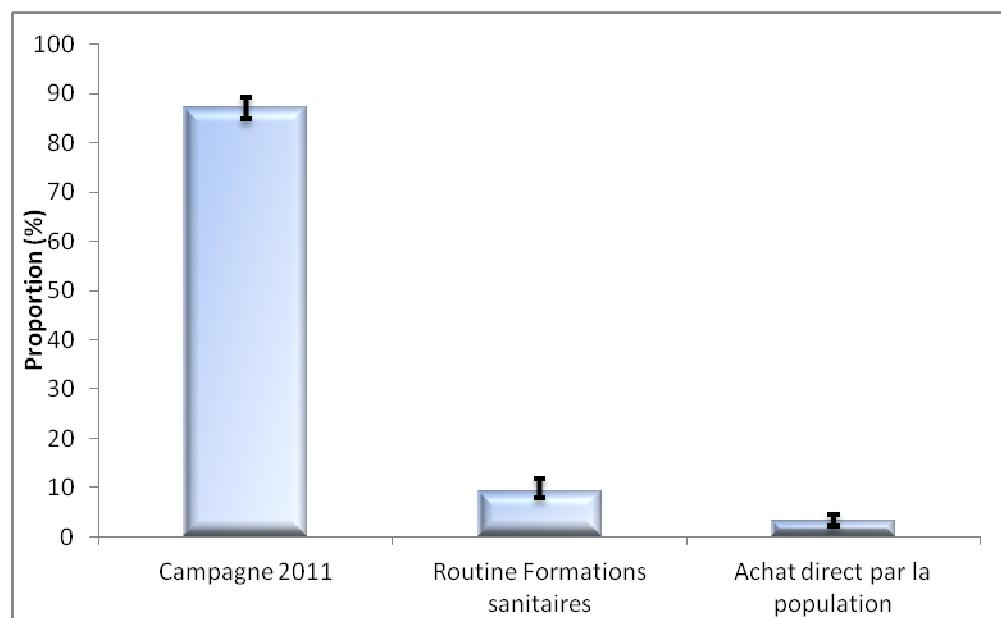


Figure 11: Origines des MIILD

2.3 Facteurs associés à la disponibilité des MIILD

Le sexe des chefs de ménages (homme ou femme), ainsi que leur niveau d'instruction n'ont pas été liés à la disponibilité des MIILD ($p > 0,05$). En outre, il n'y a pas de relation entre les différentes catégories d'âge (les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes et les personnes de plus de cinq ans) et la disponibilité des MIILD ($p > 0,05$) (tableau VI).

Tableau VI: Régression multivariée sur la disponibilité des MIILD

Facteurs	% Possession MIILD (n)	IC 95	p-value
Chefs de ménages	88,96 (854)		
Sexe des chefs de ménages			
Homme	43,85 (421)	[40,72-46,99]	0,680
Femme	45,10 (433)	[41,96-48,25]	
Niveau d'instruction des chefs de ménages			0,332
Analphabet	60,31 (579)	[57,22-63,41]	
Elémentaire	17,5 (168)	[15,10-19,90]	
Post élémentaire	11,15 (107)	[9,16-13,14]	

IC : intervalle de confiance

2.4 Utilisation des MIILD

Sur un total de 1746 MIILD enregistrées, 42,96 % (n = 750) ont été observées par les enquêteurs. 84% des moustiquaires ont été déclarées utilisées par les ménages la nuit précédant l'enquête. La proportion de MIILD en utilisation dans les clusters a varié de 47% à 100%, mais elle n'est pas significativement différente dans les deux types de zone (tableau VII). En effet, le taux d'utilisation des MIILD a été respectivement de 84% et 85% dans les zones R+ et R+++. Lorsque nous considérons les deux types de localités, nous n'observons aucune différence entre les utilisateurs de MIILD et les non utilisateurs de MIILD ($p>0,05$) (figure 12). C'est seulement à Araromi que le taux d'utilisation des moustiquaires a été très faible par rapport aux autres clusters. Parmi les groupes cibles, 76,4% (73,46-79,34) des femmes enceintes ont utilisé réellement les MIILD, 82,88% (80,87-84,91) des enfants de moins de 5 ans ont utilisé les moustiquaires tandis que 69,78% (68,22-71,34) des personnes de plus de 5 ans ont été déclarées comme utilisant les MIILD (figure 13).

Tableau VII: Régression multivariée sur l'utilisation des MIILD

Communes	Clusters	Utilisation MIILD			Proportion M+ (%)	OR	p
		M-	M+	Total			
KETOУ	Okpometa (ND)	7	23	30	77	3,75	0,0194
	Omou (ND)	1	29	30	97	33,14	0,0012
	Kpankoun (R+)	3	27	30	90	10,26	0,001
	Oke Ola (R+)	7	23	30	77	3,75	0,0194
	Idena2 (R+)	10	20	30	67	2,28	0,1208
	Adjozounme (R+++)	0	30	30	100	69,41	0,0039
	Mowodani (R+++)	9	21	30	70	2,66	0,0698
POBE	Idena3 (R+++)	8	22	30	73	3,14	0,0379
	Okoffi 2 (ND)	4	26	30	87	7,42	0,002
	Agbarou (R+++)	13	17	30	57	1,49	0,4391
SAKETE	Ikemon (ND)	1	29	30	97	33,14	0,0012
	Igbola (R+)	4	26	30	87	7,42	0,002
	Igboabikou (R+++)	3	27	30	90	10,26	0,001
	Alabansa (R+++)	11	19	30	63	1,97	0,1967
	Iwai (R+++)	4	26	30	87	7,42	0,002
	Djohounkolle (R+++)	5	25	30	83	5,71	0,0044
IFANGNI	Akadja (ND)	6	24	30	80	4,5714	0,0094
	Djegou Djedji (ND)	6	24	30	80	4,5714	0,0094
	Zougoudo (ND)	9	21	30	70	2,66	0,0698
	Daagbe (R+)	9	21	30	70	2,66	0,0698
	Gblo Gblo (R+)	14	16	30	53	1,3	0,6058
	Ita Kpako (R+)	0	30	30	100	69,41	0,0039
	Itassumba (R+)	2	28	30	93	16	0,0007
	Ketougbekon (R+)	11	19	30	63	1,97	0,1967
	Ko-Aïdjedo (R+)	0	30	30	100	69,41	0,0039
	Lokossa (R+)	10	20	30	67	2,28	0,1208
	Zian (R+)	2	28	30	93	16	0,0007
	Araromi (R+++)	16	14	30	47	1	-
	Banigbe (R+++)	6	24	30	80	4,5714	0,0094
	Ko Dogba (R+++)	9	21	30	70	2,66	0,0698
	Kokoumolou (R+++)	9	21	30	70	2,66	0,0698
	Tchaada (R+++)	9	21	30	70	2,66	0,0698
Total		208	752	960	78,3		

M+: Ménage où tout le monde utilise les MIILD le jour précédent l'enquête

M-: Ménage où tout le monde n'utilise pas les MIILD le jour précédent l'enquête

OR: odd ratio;

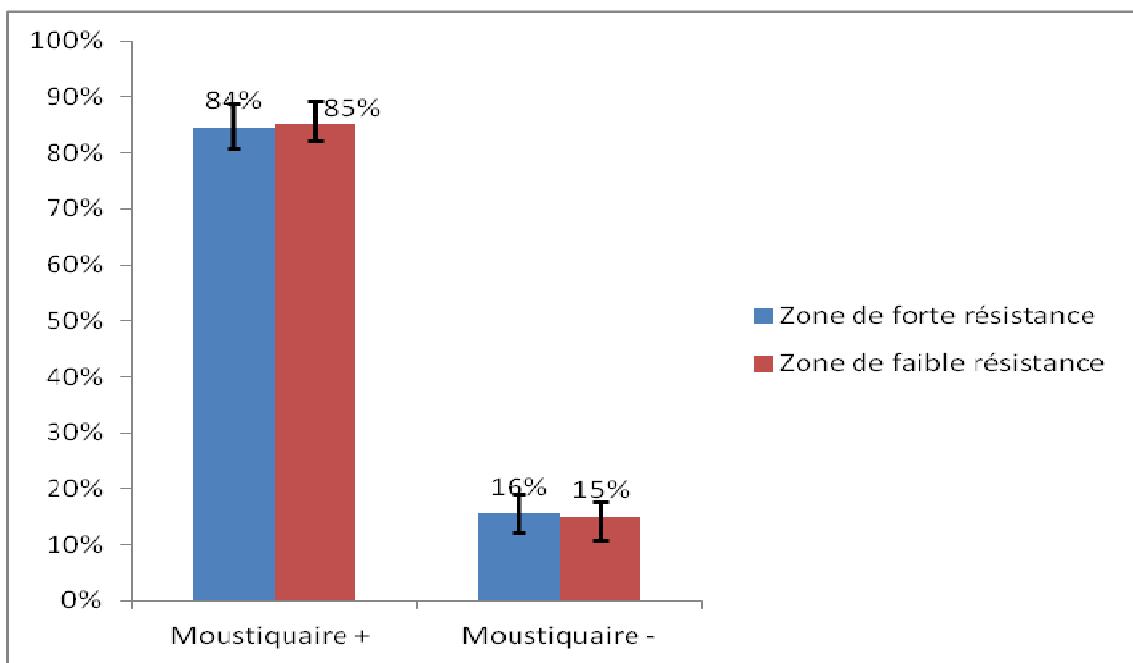


Figure 12: Utilisation des MIILD selon les localités de faible et de forte résistance des vecteurs

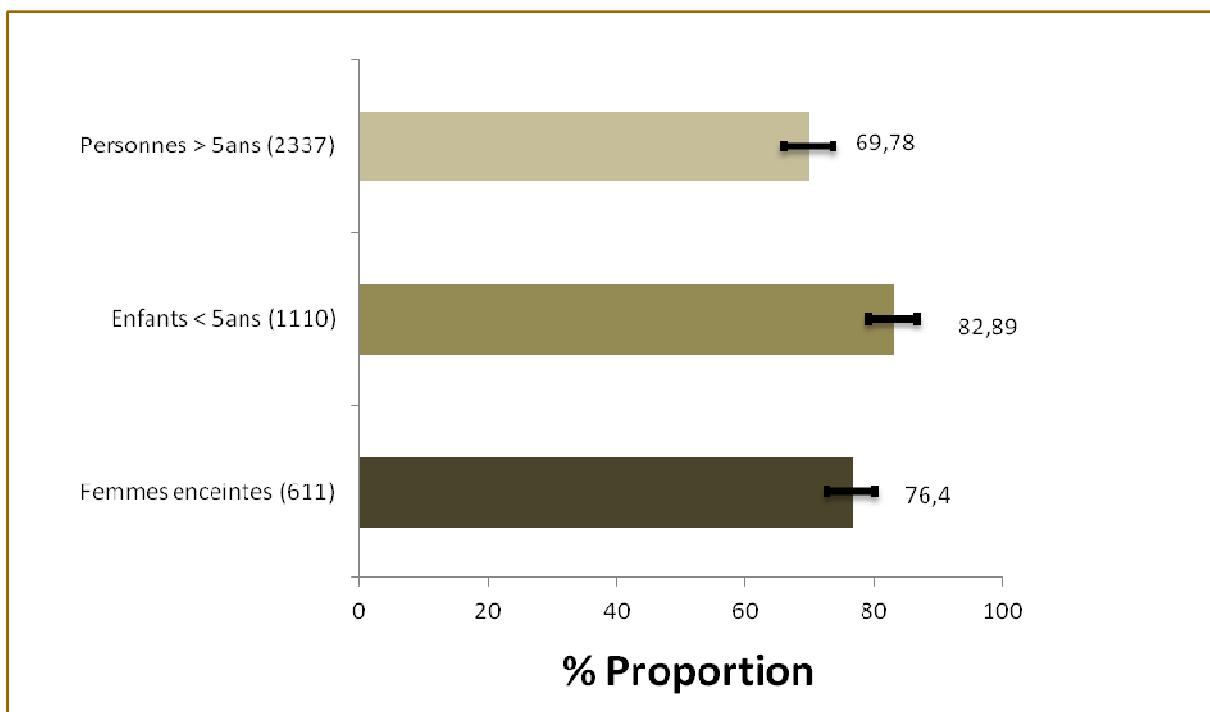


Figure 13: Taux des MIILD utilisées dans les groupes cibles (enfants<5ans et femmes enceintes) et non cibles (personnes >5ans)

Sur les 807 moustiquaires observées, environ 19, 15% ont été trouvées trouées dans les deux zones de résistance (tableau VIII). Les MIILD trouées ont été significativement plus élevées

en zone de faible résistance (22,95%) qu'en zones de forte résistance (15,88%) ($p<0,05$). Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les catégories de trous (T1-T4) et la comparaison de l'état physique des moustiquaires par rapport au niveau d'instruction de leurs propriétaires ($p > 0,05$).

Tableau VIII: Conditions physiques des MIILD en fonction des zones de résistance

	Niveau d'instruction	MIILD sans trous	MIILD avec trous				Total MIILD avec trous	% MIILD avec trous
			T1	T2	T3	T4		
R+	Analphabète	142	10	18	10	11	49	25,65
	Ecole primaire	56	6	1	3	3	13	18,84
	Post école primaire	27	2	1	2	0	5	15,63
	<i>Total R+</i>	225	18	20	15	14	67	22,95
R+++	Analphabète	197	17	15	1	1	34	14,72
	Ecole primaire	56	6	8	0	0	14	20,00
	Post école primaire	33	5	0	1	0	6	15,38
	<i>Total R+++</i>	286	28	23	2	1	54	15,88
R+ et R+++	Analphabète	339	27	33	11	12	83	19,67
	Ecole primaire	112	12	9	3	3	27	19,42
	Post école primaire	60	7	1	3	0	11	15,49
	<i>Total R+et R+++</i>	511	46	43	17	15	121	19,15

3. Discussion

La couverture des ménages en MIILD a été augmentée par la campagne de distribution universelle avec une proportion de 88,96% des ménages disposant d'au moins une moustiquaire imprégnée. Cette proportion est plus élevée par rapport à l'évaluation de la campagne de distribution précédente (Tokponnon *et al.*, 2013), et le nombre moyen de moustiquaires imprégnées d'insecticide par ménage a été de 2 environ. En comparant nos deux types de zone, le taux de couverture en MIILD est le même en zone de faible résistance (1,70 MIILD par ménages) qu'en zone de forte résistance (1,82 MIILD par ménages) ($p>0,05$). Ces résultats montrent que la couverture universelle qui est d'une MIILD pour 2 personnes prévue par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) n'est pas atteinte lors de la distribution.

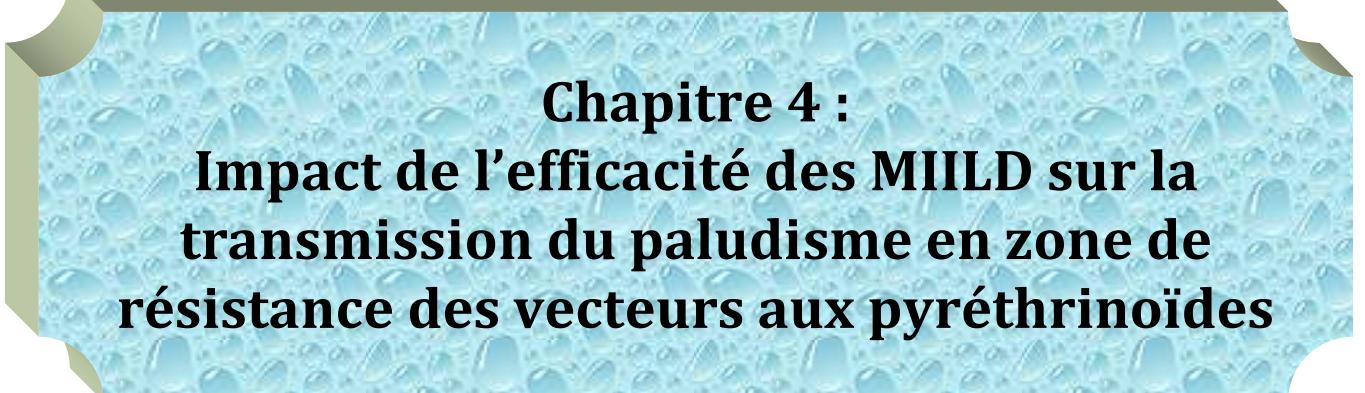
Les MIILD reçues lors de la campagne de distribution ont été significativement plus élevées (87%) comparativement à celles qui ont été achetés (3%) ou reçues par les femmes enceintes pendant la consultation prénatale (9%). Dans notre étude, le nombre moyen de moustiquaires par ménage visité a été de 1,82 en tenant compte des 960 ménages. La taille moyenne des ménages était de 4,88 personnes visitées. Ainsi, nous pouvons dire qu'environ deux moustiquaires sont disponibles pour 5 personnes au niveau des ménages. Cependant, l'objectif de cette campagne est d'augmenter le niveau de couverture de 56 % (PNLP, 2012) à au moins 80% et d'avoir une moustiquaire pour deux personnes dans la population générale. Dans le protocole de la campagne de distribution de MIILD de Juillet 2011, les ménages de deux personnes ont été couverts avec deux moustiquaires et cette règle a été respectée dans les zones rurales où la distribution a été faite avec moins de problèmes (Tokponnon *et al.*, 2013). Nos observations sont conformes aux mêmes exigences un an après la campagne. Un inconvénient de la distribution reside dans le fait que 11% des ménages n'ont pas reçu de MIILD (PNLP, 2012). Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives entre la disponibilité des moustiquaires dans les différents villages lors de l'examen de la proportion de ménages disposant d'au moins deux moustiquaires. Cette proportion a été plus élevée par rapport à ceux qui ont trois ou quatre MIILD en raison du fait que la campagne de distribution des MIILD a limité le nombre de moustiquaires distribuées pour deux personnes et un maximum de 8 moustiquaires pour les familles de grandes tailles. Cette observation est une bonne performance et la couverture atteinte a été similaire à celle qui a été réalisée dans d'autres pays (la Tanzanie, le Nigeria et le Togo) (West *et al.*, 2012 ; Stevens *et al.*, 2013). La distribution continue des moustiquaires aux femmes enceintes et aux enfants de moins de cinq ans est un bon moyen pour accroître la couverture des moustiquaires et remplacer les moustiquaires déchirées (RBM, 2011). Un système de distribution continue supplémentaire, via les ONG par exemple, peut également être prévu pour les autres ménages.

78% des moustiquaires observées ont été signalées utilisées la nuit précédant l'enquête. Dans les deux zones de résistance, nous avons noté une forte utilisation des MIILDS (84%) distribuées en 2011. Ce fort taux d'utilisation est similaire dans les deux zones ($p>0,05$) suggérant ainsi, que la sensibilisation à l'utilisation des moustiquaires a été un succès. Ainsi, la résistance n'a pas modifié l'utilisation des MIILD contrairement aux travaux de Gnanguenon *et al.* (2013) où la résistance augmente la pression d'utilisation des MIILD. Mais l'utilisation totale des moustiquaires par le groupe cible n'a pas été atteinte. 76,4% des femmes enceintes ont utilisé les MIILD alors que seulement 82,88 % des enfants de moins de cinq ans ont utilisé leur moustiquaire. Cette observation suggère que l'utilisation des

moustiquaires pourrait être améliorée dans le groupe cible. La forte utilisation des MIILD pourrait être une conséquence de la disponibilité accrue de moustiquaires imprégnées d'insecticide au niveau des ménages en raison de la campagne de distribution universelle. Cette observation a été déjà faite en Tanzanie par West *et al.* (2012). Le niveau d'utilisation des MIILD peut être aussi influencé par une température élevée (le climat) et par la densité des moustiques (Graves *et al.*, 2011). Mais comparativement à d'autres études, l'utilisation des MIILD observée dans le groupe cible de cette étude a été plus élevée que celle observée en Tanzanie et au Nigeria (Ye *et al.*, 2012; West *et al.*, 2012). La possession et l'utilisation des MIILD semblent refléter leur couverture générale dans l'ensemble de la population. De plus, la proportion de moustiquaires de la campagne de distribution retrouvées en bon état a été significativement plus élevée que celles observées en mauvais état pratique ou déchirées. En effet, le degré d'usure est faible en zones R+ et R+++.

4. Conclusion

La campagne de distribution universelle au Bénin a augmenté de façon significative la couverture des MIILD et l'appropriation stratégique de la communauté. Les personnes non cibles et les personnes cibles (femmes enceintes et enfants de moins de cinq ans) ont un même niveau de possession et d'utilisation des MIILD. Les niveaux de disponibilité et de l'utilisation des MIILD ont été également similaires entre les villages. Il s'agit ainsi d'un indicateur important de l'objectif de couverture universelle. Le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides n'a pas montré un effet sur la disponibilité et l'utilisation des MIILD observées sur le terrain un an après la campagne MIILD de 2011. Mais un effort supplémentaire doit être fait pour atteindre pleinement l'objectif de la couverture universelle et la distribution de routine doit être poursuivie pour maintenir la couverture en MIILD. La principale leçon à tirer de cette étude est l'homogénéité des deux zones R⁺ et R⁺⁺⁺ en termes du taux de couverture, d'utilisation et de l'état des moustiquaires. Cela nous permet d'étudier l'impact de la résistance en minimisant certains biais qui pourraient influencer les résultats.



Chapitre 4 :
Impact de l'efficacité des MIILD sur la
transmission du paludisme en zone de
résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes

Le but de cette étude est de comparer l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide dans deux zones, une zone R⁺ (zone de faible résistance) et une zone R⁺⁺⁺ (zone de forte résistance).

En 2011, les deux zones R⁺ et R⁺⁺⁺ ont été identifiées au début de l'étude. Or, compte tenu du fait que la résistance est un phénomène dynamique qui évolue rapidement dans le Plateau en raison probablement de l'atteinte de la couverture universelle en MIILD, en 2012, certains des clusters identifiés en 2011 comme de faible résistance ont perdu leur statut de faible résistance et sont devenus des clusters de forte résistance. Inversement, pour des raisons non encore élucidées, des clusters étiquetés de forte résistance perdaient également leur statut de forte résistance. Cette fluctuation est également facilitée par le fait que la barrière entre les zones R⁺ et R⁺⁺⁺ représentée par la valeur seuil de 80% est très fragile. En conséquence, les deux groupes de clusters R⁺ et R⁺⁺⁺ sont déséquilibrés, ce qui complique les comparaisons.

Pour minimiser les conséquences d'une telle fluctuation, nous avons décidé, en 2012, de recueillir les informations sur la transmission du paludisme dans un groupe de clusters choisis au hasard et parallèlement, suivre le niveau de résistance de *An. gambiae* tout le long de l'année et déterminer la valeur médiane des taux de mortalité des moustiques testés. L'avantage de cette démarche consiste à disposer de deux zones R⁺ et R⁺⁺⁺ homogènes. Sur cette base, la valeur médiane déterminée en fin d'année 2012 qui sépare les deux zones est de 79% de mortalité chez *An. gambiae*. Ainsi, tous les clusters où le taux de mortalité de *An. gambiae* est inférieur à 79% constituent la zone R⁺⁺⁺. Le deuxième groupe de clusters (mortalité de *An. gambiae* supérieure à 79%) appartient à la zone R⁺.

Sur cette base, en 2012 et 2013, les indicateurs entomologiques de la transmission (taux de piqûre, indice sporozoïtique, taux d'inoculation entomologique) du paludisme ont été analysés en fonction des deux zones.

L'objectif de cette partie de nos travaux est d'évaluer l'impact de l'efficacité des moustiquaires imprégnées sur la transmission du paludisme en zones de forte et de faible résistances des vecteurs aux pyréthrinoïdes.

Pour atteindre cet objectif, nous avons étudié l'impact de l'efficacité des moustiquaires imprégnées sur le taux de piqûre des anophèles, l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique.

Des enquêtes entomologiques ont été réalisées dans les deux catégories de localités après la distribution des MIILD. Des captures de moustiques sur appât humain ont été organisées. Les moustiques issus de ces captures ont été identifiés et traités et les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme ont été déterminés.

1. Matériel et méthodes

1.1 Zone d'étude

L'étude s'est déroulée dans le département du Plateau situé au sud-est du Bénin et plus précisément dans les communes de Ifangni, Sakété, Pobè et Kétou. Sur les 32 clusters retenus pour l'ensemble de l'étude, 8 ont été choisis au hasard pour le suivi de la transmission du paludisme dont 4 dans chaque zone de résistance. Il s'agit de : Itakpako (R^+), Itassouumba (R^+), Igbola (R^+), Idéna 2 (R^+), Djohounkollé (R^{++}), Mowodani (R^{++}), Okoofi (R^{++}), Kokoumolou (R^{++}).

1.2 Echantillonnage des populations de moustiques

Pour la mesure de la transmission, nous avons récolté dans chaque cluster des anophèles et évalué la fréquence des piqûres infectées que reçoit un homme dans une nuit. Des captures ont été organisées sur des sujets humains volontaires qui, au préalable, ont donné leur consentement favorable pour le déroulement de l'activité. Pour chaque cluster, les captures ont été organisées dans 2 maisons, à l'intérieur et à l'extérieur, à l'aide des aspirateurs à bouche (figure 14). Les captures de moustiques ont été réalisées de 21 h à 05 h du matin. Deux séances de captures de nuit ont été effectuées par mois dans chaque cluster, soit au total 64 captures nuit/mois pour l'ensemble des 8 clusters. Les données enregistrées ont permis d'évaluer le nombre de piqûres que reçoit un homme par nuit pour chaque zone, l'âge physiologique et le taux d'inoculation entomologique (TIE) d'*Anopheles gambiae*.



.
Figure 14 : Capture de nuit sur appât humain

1.3 Traitement des moustiques

Après chaque nuit de capture, les moustiques capturés ont été identifiés le lendemain matin selon le genre et l'espèce à partir de la clé de Gilles et de Meillon (1968) à l'aide de la loupe binoculaire. Les ovaires d'une partie des anophèles vecteurs ont été disséqués afin de déterminer le taux de parturité, en observant le degré d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). Les têtes et thorax de ces anophèles ont été conservés séparément selon le lieu de capture dans des tubes Eppendorf étiquetés contenant du silicagel à -20°C pour la recherche de l'infection par la méthode de titrage immunoenzymatique (ELISA-CSP).

1.4 Recherche de l'infection par la méthode ELISA

Pour déterminer le taux d'infection des anophèles femelles au *P. falciparum*, la méthode de titrage immunoenzymatique ELISA CSP (Enzym Linked Immunosorbent Assay) a été utilisée. C'est une technique colorimétrique qui consiste à rechercher les anticorps des protéines membranaires du plasmodium dans la tête et le thorax des moustiques. Cette procédure immunologique est basée sur la réaction anticorps-antigène permettant de détecter la présence du parasite au stade sporozoïtique chez le moustique (Burkot *et al.*, 1984 ; Lombardi *et al.*, 1987).

1.5 Analyse des données

Le taux d'inoculation entomologique (TIE) représentant le nombre de piqûres infectantes reçues par homme et par unité de temps (jour, mois ou année) a été calculé pour chaque zone afin de mesurer l'intensité de la transmission palustre. Il a été calculé en faisant le produit du taux de piqûre (ma) par l'indice sporozoïtique (Is) ($TIE = ma \times Is$). Les taux de piqûre et les TIE ont été comparés entre les zones à l'aide du test de Poisson.

2. Résultats

2.1 Variation de l'agressivité de *An. gambiae* sur homme (ma) 24 mois après la mise en place des MIILD dans les zones de faible et de forte résistances

Le tableau IX montre le nombre moyen de piqûre reçu par un homme pendant une nuit, 6 mois, 12 mois, 18 mois et 24 mois après la mise en place des MIILD dans les zones de forte et de faible résistance des vecteurs aux insecticides.

Pendant les 24 mois, le nombre de piqûre que reçoit un homme par nuit a été significativement plus élevé ($p<0,0001$) dans les zones de forte résistance (R^{+++}) que dans les zones de faible résistance sans Itassoumba ($R^+ - Itassoumba$). En effet, le taux de piqûre a été de 3,22 ; 2,73 ; 2,13 et 1,77 piqûres/homme/nuit dans les zones R^{+++} contre 0,36 ; 0,43 ; 0,40 et 0,39 dans les zones $R^+ - Itassoumba$ respectivement 6 mois, 12 mois, 18 mois et 24 mois après la mise en place des MIILD (tableau IX).

Par contre, dans les zones de faible résistance avec Itassoumba ($R^+ + Itassoumba$) la situation est contraire. Le taux de piqûre a été de 8,53 ; 11,18 ; 10,30 et 10,30 piqûres/homme/nuit dans ces zones contre 3,22 ; 2,73 ; 2,13 et 1,77 dans les zones R^{+++} respectivement 6 mois, 12 mois, 18 mois et 24 mois après la mise en place des MIILD (tableau IX).

Tableau IX : Taux de piqûre (ma) de *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistantes 2 ans après la mise en place des MIILD dans le Plateau

Périodes	Zones	Total vecteur	Homme nuit	ma (nuit)	RR	IC-95%	p
6 mois (Juil 11-Déc 11)	R ⁺⁺⁺	566	176	3,22	1	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	1502	176	8,53	2,65	[2.41-2.92]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	47	132	0,36	0,11	[0,08-0,15]	<0.0001
12 mois (Juil 11-Juin 12)	R ⁺⁺⁺	1004	368	2,73	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	4113	368	11,18	43.94	[41.27-46.77]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	119	276	0,43	0,16	[0,13-0,19]	<0.0001
18 mois (Juil 11-Déc 12)	R ⁺⁺⁺	1190	560	2,13	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	5769	560	10,30	4,85	[4,55-5,16]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	168	420	0,40	0,19	[0,16-0,22]	<0.0001
24 mois (Juil 11-Juin 13)	R ⁺⁺⁺	1273	720	1,77	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	7415	720	10,30	5,82	[5,49-6,18]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	211	540	0,39	0,22	[0,19-0,26]	<0.0001

RR=Rate Ratio IC-95% = Intervalle de confiance de 95% de chance de RR

2.2 Impact de l'efficacité des MIILD sur la transmission du paludisme en zone de faible et de forte résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes

Au total, 4228 têtes-thorax de *An. gambiae* ont été soumis à l'ELISA CSP dont 724 pour les zones de forte résistance et 3504 pour les zones de faible résistance (tableau X). Sur le total testé, 220 ont été positifs au *P. falciparum*. L'indice sporozoïtique moyen est de 0,052.

6 mois, 12 mois et 18 mois après la mise en place des MIILD, l'infectivité des moustiques est similaire ($p>0,05$) dans les zones de forte (R⁺⁺⁺) et de faible résistances (R⁺ - Itassoumba ; R⁺ + Itassoumba). 24 mois après intervention, l'indice sporozoïtique a été significativement plus élevé dans les zones R⁺⁺⁺ que dans les zones R⁺ + Itassoumba. Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre l'indice sporozoïtique des zones R⁺⁺⁺ et R⁺ - Itassoumba 24 mois après la mise en place de l'intervention.

Les TIE obtenus dans les zones R⁺⁺⁺ ont été significativement plus élevés ($p<0,0001$) que ceux obtenus dans les zones R⁺ - Itassoumba pendant les périodes d'évaluation. En effet, le

TIE a varié de 66,69 piqûres infectées/homme/6mois à 89,67 pi/h/24 mois dans les zones R⁺⁺⁺ contre 9,71 pi/h/6mois à 16,62 pi/h/24 mois dans les zones R⁺ - Itassoumba (tableau X). Par contre, la situation est contraire dans les zones R⁺ + Itassoumba. Dans ces zones, le TIE a été significativement plus élevé ($p<0,0001$) que dans les zones de forte résistance R⁺⁺⁺ pendant toute la période d'étude.

Tableau X : Taux d'inoculation entomologique (TIE) observés chez *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistances 2 ans après la mise en place des MIILD dans le Plateau

Périodes	Zones	Thorax testés	Thorax (+)	Is (%)	ma (p/h/nuit)	pi/h/ nuit	TIE/ période	RR	IC 95% (RR)	p
6 mois (Juil 11-Déc 11)	R ⁺⁺⁺	269	31	11,52	3,22	0,37	66,69	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	358	43	12,01	8,53	1,02	184,49	2.77	[2.09-3.68]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	33	5	15,15	0,36	0,05	9,71	0.14	[0.07-0.31]	<0.0001
12 mois (Juil 11-Juin 12)	R ⁺⁺⁺	488	39	7,99	2,73	0,22	78,49	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	1633	120	7,35	11,18	0,82	295,67	3.78	[2.95-4.83]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	114	9	7,89	0,43	0,03	12,25	0.15	[0.08-0.30]	<0.0001
18 mois (Juil 11-Déc 12)	R ⁺⁺⁺	646	48	7,43	2,13	0,16	85,26	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	2546	140	5,50	10,30	0,57	305,90	3.60	[2.84-4.56]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	194	13	6,70	0,40	0,03	14,47	0.17	[0.09-0.31]	<0.0001
24 mois (Juil 11-Juin 13)	R ⁺⁺⁺	724	51	7,04	1,77	0,12	89,67	1.00	-	-
	R ⁺ + Itassoumba	3504	169	4,82	10,30	0,50	357,63	3.98	[3.16-5.01]	<0.0001
	R ⁺ - Itassoumba	237	14	5,91	0,39	0,02	16,62	0.18	[0.1-0.32]	<0.0001

RR=Rate Ratio IC-95% = Intervalle de confiance de 95% de chance de RR

2.3 Impact des MIILD sur la longévité de *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistance aux insecticides

Un moustique pare est un moustique épidémiologiquement dangereux. Ainsi, le taux de parturité qui est un paramètre secondaire de la transmission, permet d'avoir une idée sur la longévité des anophèles du milieu.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré une variation des taux de parturité en fonction des zones de résistance et des périodes d'étude (tableau XI). Le taux de parturité est

le même ($p>0,05$) en zone de faible résistance sans Itassoumba (R^+ - Itassoumba) qu'en zone de forte résistance (R^{+++}). Par contre, quand nous considérons les zones de faible résistance avec Itassoumba, nous avons noté une différence significative entre le taux de parturité des zones R^{+++} et celui des zones $R^+ +$ Itassoumba ($p<0,05$) 12 mois, 18 mois et 24 mois après la mise en place des MIILD (tableau XI).

Tableau XI : Taux de parturité observés chez *An. gambiae* dans les zones de faible et de forte résistantes 2 ans après la mise en place des MIILD dans le Plateau

Périodes	Zones	N testé	Pares	Taux de parturité	OR	IC-95% (OR)	p
6 mois (Juil 11-Déc 11)	R^{+++}	304	241	79,27	1.00	-	-
	$R^+ +$ Itassoumba	698	576	82,52	0.81	[0.58-1.14]	0.2495
	$R^+ -$ Itassoumba	48	37	77,08	1.14	[0.55-2.36]	0.7059
12 mois (Juil 11-Juin 12)	R^{+++}	509	396	77,80	1	-	-
	$R^+ +$ Itassoumba	1296	930	71,76	1.38	[1.08-1.76]	0.0091
	$R^+ -$ Itassoumba	160	128	80,00	0.88	[0.56-1.36]	0.5842
18 mois (Juil 11-Déc 12)	R^{+++}	649	514	79,20	1.00	-	-
	$R^+ +$ Itassoumba	2430	1822	74,98	1.27	[1.03-1.57]	0.0263
	$R^+ -$ Itassoumba	261	217	83,14	0.77	[0.53-1.12]	0.1969
24 mois (Juil 11-Juin 13)	R^{+++}	758	611	80,606	1.00	-	-
	$R^+ +$ Itassoumba	3361	2536	75,45	1.35	[1.11-1.65]	0.0024
	$R^+ -$ Itassoumba	328	269	82,01	0.91	[0.65-1.27]	0.6138

OR=Odds Ratio

IC-95% = Intervalle de confiance de 95% de chance de OR

3. Discussion

Les MIILD ont eu un grand impact sur les anophèles vecteurs et sur la transmission du paludisme dans les zones de faible résistance depuis sa mise en œuvre comparativement aux zones de forte résistance.

Les indicateurs de la transmission du paludisme dans le département du Plateau ont varié dans les deux zones de résistance. L'étude a montré que l'agressivité anophélien exprimée dans ce travail en termes de piqûres de *An. gambiae* par homme par nuit (ma) a été forte dans les

zones de faible résistance comparativement aux zones de forte résistance pendant toute la période d'étude. La forte valeur du ma notée dans les zones de faible résistance comparativement aux zones de forte résistance pendant toute la période d'étude s'explique par le fait que, à Itassoumba, un village R⁺, se pratique des activités de productions piscicole et maraîchère (Sovi *et al* 2013a ; Sovi *et al* 2013b). En effet, l'aménagement et l'entretien des bassins piscicoles et des maraîchers servent de gîtes pour la ponte et l'alimentation des anophèles pendant toute l'année. Ces résultats confirment les travaux de Protopopoff *et al.* (2009) qui ont montré que la densité des anophèles est plus élevée dans les localités situées aux abords des cours d'eau, des fleuves et des marais par rapport à celles qui en sont éloignées. De même, Manga *et al.* en 1997 au Cameroun, Klinkenberg *et al.* en 2008 au Ghana et Yadouléton *et al.* en 2010 au Bénin ont montré que les zones de cultures maraîchères sont des localités de fort développement des larves de moustiques. La dynamique des populations anophéliennes est donc en rapport avec le fonctionnement et la dynamique des gîtes larvaires.

Les taux d'infectivité ont été similaires ($p>0,05$) dans les deux catégories de zones (R⁺⁺⁺; R⁺ - Itassoumba) pendant la période d'étude (24 mois). Ces résultats confirment les travaux de Ossè *et al.* (2012) qui ont montré qu'il n'existe pas de relation entre la résistance aux pyréthrinoïdes et l'infectivité au *P. falciparum*. Par contre, la transmission du *P. falciparum* a été plus forte en zone de faible résistance (R⁺) comparativement à celle de forte résistance R⁺⁺⁺. Cette observation serait due à la forte agressivité notée dans la localité de Itassoumba (localité R⁺). Ainsi, la présence des gîtes permanents très productifs en *An. gambiae* à Itassoumba a un impact significatif sur le TIE obtenu dans la zone R⁺. De ce fait, l'utilisation du TIE pourrait ne pas être un indicateur majeur pour établir le lien entre la résistance et l'efficacité des moustiquaires. La question de l'impact entomologique des moustiques résistants sur l'efficacité des MIILD dans les conditions de terrain reste toujours une préoccupation. Nos résultats sont similaires à ceux de Henry *et al.* (2005) et de Dabiré *et al.* (2006) qui ont montré que les MIILD continuent à protéger en dépit de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes. En effet, ces auteurs ont montré la réduction de la densité des vecteurs et de la transmission du paludisme dans les habitations avec MIILD en zones de fortes résistances de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes.

Par ailleurs, aucune différence significative n'a été enregistrée entre l'infectivité des populations de *An. gambiae* au *P. falciparum* dans les zones R⁺⁺⁺ et R⁺ + Itassoumba 18 mois après la mise en place des MIILD et malgré la forte densité anophélien dans la localité de

Itassoumba. Par contre, 24 mois après la mise en place de l'intervention, le niveau de transmission est significativement plus élevé ($p<0,0001$) dans les zones R^+ + Itassoumba que celui de R^{++} . Cette situation s'expliquerait par la forte agressivité anophélien observée dans la localité de Itassoumba (Sovi *et al* 2013b).

Dans la présente étude, nous avons évalué l'impact de la résistance sur la longévité des vecteurs. Les résultats obtenus ont révélé qu'il n'y a aucune différence significative entre le taux de parturité des anophèles vecteurs dans les deux zones (R^{++} ; R^+ - Itassoumba). Par contre, quand nous considérons Itassoumba dans les zones de faible résistance, la différence du taux de parturité a été significative entre les deux types de localités et des disponibilités en MIILD similaires. La parturité serait probablement influencée par la disponibilité et la distribution des gîtes larvaires puis par l'utilisation des outils de lutte antivectorielle dans les deux zones.

Pour évaluer vraiment l'impact de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des MIILD, il serait souhaitable d'avoir deux zones: une où les anophèles sont résistants et une autre, où les populations d'anophèles sont entièrement sensibles. De plus, les deux zones doivent avoir les mêmes faciès écologiques. Malheureusement, nous ne pourrions pas trouver de telles zones et ceci constitue la limite principale de cette étude.

4. Conclusion

La présente étude n'a pas montré l'évidence d'un impact de la résistance sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée. Certes, après deux années d'évaluation, le taux de piqûre et le taux d'inoculation entomologique ont augmenté dans les zones de faible résistance comparativement aux zones de forte résistance. Toutefois, le TIE élevé observé dans les zones de faible résistance est principalement dû à la densité agressive qui est particulièrement élevée à Itassoumba. La non évidence de l'impact de la résistance sur l'efficacité des MIILD dans notre zone d'étude s'est manifestée par des indices sporozoïtiques et des taux de parturité similaires en R^+ et en R^{++} . En dehors des paramètres entomologiques, nous avons suivi l'évolution des indicateurs épidémiologiques dans les deux catégories de zones.

Chapitre 5 :

Evaluation de l'efficacité protectrice des MIILD et mesure de la prévalence de *Plasmodium falciparum* et de l'anémie chez les enfants âgés de moins de 5 ans provenant des localités de faible et de forte résistances des vecteurs aux insecticides

I. Evaluation, au niveau des formations sanitaires, de l'efficacité protectrice des MIILD chez les enfants âgés de moins de 5 ans provenant des localités de faible et de forte résistances des vecteurs aux insecticides

La lutte contre le paludisme est une priorité pour les autorités sanitaires des pays endémiques. Parmi les outils utilisés dans la prévention de cette maladie, la lutte antivectorielle constitue un axe très important et très surveillé. Les MIILD constituent le principal moyen de lutte et beaucoup d'efforts ont été consentis pour augmenter leur accessibilité aux populations en particulier aux enfants de moins de cinq ans et aux femmes enceintes. L'Enquête Démographique de Santé réalisée au Bénin en 2006 a montré que seulement 33% des enfants de moins de cinq ans et 32% des femmes enceintes dormaient sous moustiquaire imprégnée (EDSB III, 2006). Ces taux sont bien en deçà du seuil de couverture de 80% préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2005). Mais grâce à la campagne ciblée d'octobre 2007 et celle d'accès universelle de juillet 2011, la couverture et l'utilisation des MIILD au Bénin ont été nettement améliorées (EDSB IV, 2011-2012; Tokponnon *et al.*, 2013).

Le succès des MIILD dans la prévention du paludisme vient du fait qu'elles procurent à la fois une protection individuelle efficace pour les utilisateurs et une protection communautaire si le taux de couverture en moustiquaires est suffisamment important pour diminuer la capacité vectorielle (WHO, 2005 ; WHO, 2009). Malheureusement, la résistance aux pyréthrinoïdes chez les vecteurs du paludisme ne cesse de se développer en Afrique (Ranson *et al.*, 2011) et pourrait donc compromettre ou limiter l'efficacité des MIILD dans la prévention du paludisme.

Il est donc fondamental d'évaluer l'efficacité protectrice des MIILD chez les enfants dormant en zone de résistance.

L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'effet de l'utilisation des MIILD sur la morbidité palustre dans les clusters de faible et de forte résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes.

De façon spécifique, il s'agit de :

- déterminer la morbidité palustre chez les enfants âgés de moins de 5 ans dans les deux zones de résistance;
- déterminer la proportion des cas de fièvre sans *P. falciparum* chez les enfants âgés de moins de 5 ans ;

- déterminer le portage asymptomatique de *P. falciparum* chez les enfants âgés de moins de 5 ans ;
- déterminer les facteurs influençant la présence de *P. falciparum* dans le sang ;
- évaluer l'efficacité protectrice des MIILD dans les différents clusters chez les enfants âgés de moins de 5 ans ;
- apprécier le contact homme/vecteur à travers le dosage des anticorps anti-salivaires.

I.1. Matériel et Méthodes

I.1.1 Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée dans les communes de Ifangni, Sakété, Pobè et Kétou. Dans ces communes, des clusters à faible et à forte résistance où la couverture en MIILD distribuées à la population est supérieure ou égale à 80% ont été choisis. Selon le niveau de la résistance, nous avons comparé les données obtenues dans les deux groupes d'enfants (cas et témoins) et aussi évalué l'influence de la résistance dans les deux zones R⁺ et R⁺⁺⁺.

I.1.2 Méthode d'étude

I.1.2.1 Type d'étude, échantillonnage et population d'étude

Il s'agit d'une étude transversale cas-témoin avec un témoin pour un cas qui a démarré en novembre 2011 et qui a pris fin en juillet 2012 dans les communes ci-dessus citées.

La taille de l'échantillon nécessaire des cas (n_1) et des témoins (n_2), a été estimée par la formule (1) (Hayes & Bennett, 1999) :

$$n_0 = n_1 = \frac{(Z_{\frac{1-\alpha}{2}} + Z_{1-\beta})^2 [p_0(1-p_0) + p_1(1-p_1)]}{(p_0 - p_1)^2} \quad (1)$$

p_1 est la prévalence des cas, et compte tenu de l'indisponibilité d'estimateur au niveau de la zone, elle a été fixée à 0,5.

p_0 est la prévalence espérée dans le groupe des témoins, elle a été fixée 0,25 (une réduction de 50% par rapport au groupe des cas).

$Z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ est le quantile d'ordre $\frac{1-\alpha}{2}$ de la distribution normale, avec, α le seuil fixé à 0,05

et $Z_{1-\beta}$ est le quantile d'ordre $\frac{\beta}{2}$ de la distribution normale, avec β la puissance fixée à 0,8. En se basant sur (1), la taille de l'échantillon a été estimée à environ 60 enfants dans groupe de chaque zone (zone R+ et zone R+++). Ainsi la taille globale de l'échantillon a été estimée à 240 enfants de moins de 5 ans.

L'échantillon est constitué par tous les enfants de moins de cinq ans résidant dans les localités de l'étude, depuis au moins 6 mois, reçus en consultation médical ou dans les services de vaccination dont les parents ont donné leur consentement éclairé. Nous avons recruté les 120 premiers enfants âgés de moins de 5 ans avec fièvre et les 120 premiers enfants âgés de moins de 5 ans sans fièvre reçus en consultation médicale. Quatre formations sanitaires de référence ont été identifiées dans les quatre communes pour abriter nos travaux. Il s'agit des Centres de Santé de Kétou, et de Ifangni, puis des Hôpitaux de Zone (ZS) de Sakété et de Pobè. Le recrutement dans chaque formation sanitaire a concerné les 30 premiers enfants âgés de moins de 5 ans avec fièvre et 30 premiers enfants âgés de moins de 5 ans sans fièvre.

I.1.2.2 Déroulement de l'étude

- Formation des acteurs : Dans chaque formation sanitaire, deux infirmiers et deux techniciens de laboratoire ont été formés sur le déroulement de l'étude.
- Recrutement des enfants : Les enfants de moins de cinq ans venus en consultation médicale ont fait objet d'un examen clinique complet par l'infirmier.

✓ **Ce dernier a :**

- administré la notice d'information pour obtenir le consentement éclairé des parents ;
- pris la température ;
- rempli le questionnaire en affectant un code à chaque enfant ;
- envoyé l'enfant au technicien de laboratoire;
- récupéré les résultats chez le technicien et les consigner sur le questionnaire ;
- traité les enfants malades.

✓ **Le technicien a :**

- réalisé la Goutte Epaisse (GE) et le Frottis Sanguin (FS) à partir d'un prélèvement capillaire ;
- réalisé les confettis pour la recherche d'Anticorps anti-salivaire ;
- consigné les résultats dans le cahier de paillasse et dans le registre apprêté à cet effet.

I.1.2.3 Supervision des activités

Cette supervision a été réalisée par l'équipe de gestion de l'étude toutes les deux semaines et a consisté à valider les questionnaires, les fiches de consentement remplies ainsi que les activités de laboratoire (confection des lames et réalisation des confettis). La supervision passe en revue l'organisation pratique des activités sur le terrain. Les fiches de questionnaire ont été collectées à chaque supervision dans le cadre de la gestion des données. 10% des lames confectionnées ont fait objet d'un contrôle de qualité dans le laboratoire de l'Hôpital de la Mère et de l'Enfant Lagune à Cotonou.

I.1.2.4 Préparation de la goutte épaisse/Frottis sanguin

Déposer sur la lame étiquetée, à 1 cm de son bord, une grosse goutte de sang pour la GE puis à environ 2cm une petite goutte de sang pour le FS.

I.1.2.4.1 Préparation de la goutte épaisse

- ✓ En utilisant le coin d'une autre lame, étaler la première goutte de sang par un mouvement circulaire en spirale (1 cm de diamètre) ;
- ✓ Cesser l'opération avant que la goutte de sang ne soit tout à fait sèche ;
- ✓ Déshémoglobiniser la goutte par de l'eau de robinet pendant 3 à 10mn, jusqu'à ce que la préparation soit claire.

I.1.2.4.2 Préparation du frottis sanguin

- ✓ Placer en avant de la seconde goutte de sang, une lame à bord rodé ou une lamelle;
- ✓ L'incliner à 45° et l'amener en contact de la goutte ;
- ✓ Laisser le sang s'étaler dans l'angle de 45° formé par les deux lames ;
- ✓ Tirer d'un geste rapide et en un coup sec la lame «étaleuse» vers l'extrémité libre de la lame porte objet ;
- ✓ Vérifier que tout le frottis est bien étalé et présente trois parties (tête, corps et queue) ;
- ✓ Sécher à plat la lame à l'air libre et à l'abri de la poussière, des mouches et de la chaleur ;
- ✓ Les bons frottis doivent être assez minces pour permettre de lire un papier journal à travers.

I.1.2.4.3 Coloration des gouttes épaisses et des frottis minces

- ✓ Fixer le frottis recouvert de méthanol et laisser sécher pendant 5 mn ;
- ✓ Ne pas fixer la goutte épaisse. Puis colorer la lame pendant 15 min par du Giemsa 10 % ;

- ✓ Laver à l'eau neutre ;
- ✓ Sécher et essuyer la lame du côté opposé au frottis.

I.1.2.4.4 Séchage et lecture des lames

- ✓ Sécher à l'air libre à l'abri des mouches et de la poussière.
- ✓ Rechercher au faible grossissement la zone permettant une lecture correcte (hématies et leucocytes sont bien séparés les uns des autres et ne sont pas déformés);
- ✓ Déposer une goutte d'huile à immersion et faire la mise au point ;
- ✓ Parcourir la lame suivant les bandes perpendiculaires au frottis sans revenir en arrière ;
- ✓ Compter le nombre de parasites asexués par champ pour 200 globules blancs (GB) ;
- ✓ Terminer la numération des parasites dans le dernier champ même si le nombre de 200 GB est atteint,
- ✓ Calculer la densité parasitaire/ μL ;
- ✓ Indiquer l'espèce de *Plasmodium*.

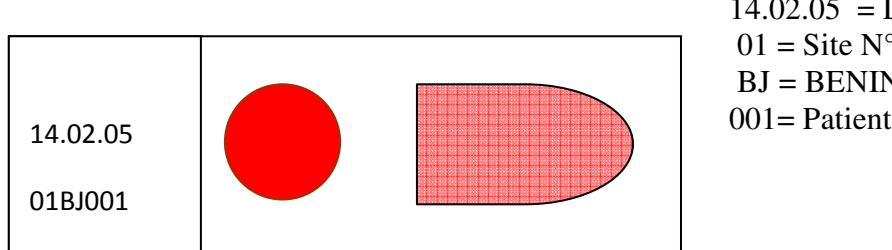
$$\text{Densité parasitaire} = \frac{\text{Nombre de Parasites comptés} \times 8.000}{\text{Nombre de GB comptés}}$$

* 1 μL de sang contient en moyenne 8 000 GB

I.1.2.5 Système de numérotation des échantillons

Une fois incluse, la fiche d'enregistrement de cas du patient doit être facilement accessible à chaque visite. Pour ce faire, un numéro unique d'identification a été attribué à chaque patient. De même, les papiers filtres et lames provenant de chaque patient ont été identifiés avec le même numéro du début à la fin de l'étude. Si un numéro est mal écrit ou si le même numéro est attribué à deux patients différents, ces enregistrements ne pourront être utilisés et seront perdus. L'exemple ci-dessous illustre comment attribuer et enregistrer le numéro d'identification d'une lame. Il a été repris sur les dossiers du patient et sur les papiers filtres et les lames ultérieures.

Exemple: Si le patient vient du site N°01 du BENIN (BJ), qu'il est le premier patient de l'étude, qu'il est recruté le 14/02/2005, son numéro est 01BJ001, et la lame sera étiquetée comme suit :



14.02.05 = Date de l'étude
 01 = Site N°1
 BJ = BENIN
 001= Patient N°1

Figure 15 : Système d'identification d'une lame de goutte épaisse prête à être colorée

I.1.2.6 Conservation des lames

Les lames de goutte épaisse ont été stockées d'une manière rationnelle afin qu'elles puissent être facilement retrouvées et réexamинées dans le cadre d'un contrôle de qualité. Les lames ont été rangées dans une boîte de lames. Les lames de visites imprévues ont été conservées ensemble. Chaque formation sanitaire avait à sa disposition au moins 1 boîte de lames de grande capacité soit 100 lames.

I.1.2.7 Confection des confettis

Un papier filtre a été réalisé par patient pour la réalisation du dosage des anticorps anti-salivaires.

I.1.2.7.1 Technique

Le papier filtre comportant 5 cercles de 12mm de diamètre a été imprégné de 5 gouttes de sang prélevé par spot. Les confettis ont été séchés à l'air libre pendant 24 heures, conservés dans des sacs plastiques individuels puis dans des emballages à sangle étanche (contenant un dessicteur, gel de silice) et un témoin d'humidité à température ambiante jusqu'à la réalisation des tests génotypiques et ELISA et transportés aux laboratoires du CERPAGE et du CLIP.

Il faut noter que chaque confetti est étiqueté en mentionnant la date de confection, les initiales des noms et prénoms de l'individu et son numéro d'identification, selon la figure suivante :

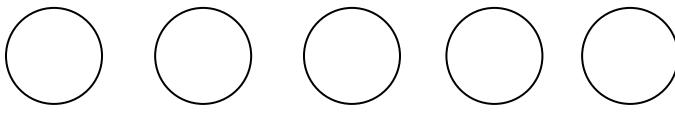

Spec #:-----
Date:-----

Figure 16 : Illustration d'un papier de confetti

I.1.2.7.2 Conservation des papiers filtres

Les échantillons de sang sur papiers filtres (PF) sont séchés complètement pour éviter le développement de champignons. Le technicien doit s'assurer que chaque papier filtre porte la même information que la lame de la GE. Il doit vérifier de façon périodique (une fois par semaine) le témoin d'humidité, au cas où il changerait de couleur, et le remplacer systématiquement.

I.1.2.8 Dosage des anticorps

Il a été fait selon la technique de Fontenille décrite par Beier *et al.* (1998).

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

- Pour 1/2 litre, prendre 2,5 g de caséine dans 50 ml de NaOH 0,1N;
- Agiter pendant 2 heures ;
- Préparer le Tampon Citrate pH4 ;
- 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 ;
- Découper le spot, le mettre dans environ 0,8 ml de PBS ;
- Laisser au moins 1 heure ;
- Sensibiliser les plaques (Mettre 50 µl de solution de sang à tester par puits) ;
- Préparer les anticorps spécifiques d'espèces marqués à la peroxydase ;
- Reconstituer les IgG marquées selon la notice. Garder au congélateur ;
- Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les sérum hétérologues au 1/1000^{ème} ;
- Laver 2 fois au PBS-Tween ;
- Distribuer 50 µl par puits de solution d'IgG marquées. Mettre une IgG par rangée ;
- Incubation 1 h à RT sur la paillasse ;
- vider la plaque. laver 4 fois au PBS/tween 20 ;
- Lire à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa.

I.1.2.9 Prise en charge des cas

Tous les cas de paludisme ont été pris en charge par l'étude selon la politique nationale. Tous les autres cas ont été transférés dans le circuit normal de l'hôpital pour une prise en charge.

I.1.2.10 Considérations éthiques

L'étude a été soumise au Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé qui a donné son avis favorable. Le consentement éclairé des parents d'enfants a été obtenu sous forme écrite. La confidentialité des données et l'anonymat ont été respectés. La prise en charge des bilans et du traitement du paludisme simple a été gratuite. Une notice d'information mentionnant les objectifs de l'étude, les avantages, les risques et inconvénients a été lue aux participants de l'étude.

I.1.2.11 Gestion et analyses des données

Les données ont été saisies en double de manière indépendante dans une base de données à l'aide du logiciel Epi data. Les analyses de données ont été faites grâce au logiciel SPSS 16.0 d'une part et le logiciel GraphPad Prism5 logiciel statistique ® (GraphPad, San Diego, CA, USA) pour l'évaluation de la moyenne des densités parasitaires et la médiane des taux d'anticorps anti-salivaires d'autre part. Les différences de proportion ont été analysées par le test d'égalité de deux proportions. La répartition des ADO n'est pas normalement (gaussienne) distribuée. Ainsi, des tests non paramétriques ont été utilisés pour comparer les niveaux d'anticorps. Le Test de Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison des niveaux d'anticorps de deux groupes indépendants, et le test de Kruskal-Wallis non paramétrique a été utilisé pour comparer les ADO entre plus de deux groupes. Toutes les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$.

- ✓ Les indices parasitologiques ont été calculés en termes de prévalence de *Plasmodium falciparum* et de densité parasitaire des formes asexuées de *P. falciparum* / μ L de sang. La densité parasitaire moyenne a été calculée chez les sujets parasitologiquement positifs après transformation logarithmique.
- ✓ L'association entre les prévalences, l'utilisation des MIILD, la splénomégalie, les moyennes géométriques des densités parasitaires a été testée par un modèle de régression logistique, en tenant compte du statut clinique (cas versus témoin), et aussi en fonction du statut des clusters de provenance. La fraction des fièvres attribuable au paludisme est estimée à partir des odds ratios associés aux densités parasitaires estimées dans le modèle (Schellenberg *et al.*, 1994).
- ✓ Les fractions préventives des interventions contre les accès palustres simples, a été calculée chez les cas et les témoins et en milieu de soins à partir des Odds Ratios obtenus dans les études cas-témoins ($FP = 1-OR$). Les médianes de taux d'Anticorps anti-gSG6-P1 ont été déterminées à partir de GraphPad Prism5 logiciel statistique ®. Les tests non

paramétriques de Mann-Whitney et de test de Kruskal Wallis ont été utilisés pour comparer respectivement les médianes de deux et plus de variables

I.2. Résultats

De décembre 2011 à juillet 2012, 240 enfants ont été recrutés dans les 4 formations sanitaires participant à l'étude. Un total de 55 enfants ont été testés positifs chez les enfants de moins de cinq ans, avec un taux minimum de 64 parasites par microlitre de sang et un taux maximum de 178 400 parasites par microlitre de sang. Pour les 120 cas, nous avons les caractéristiques des Densités Parasitaires (DP) qui se présentent comme suit : minimum 128 ; maximum 128 000 ; Moyenne 29096 et médiane 6480. Pour les 120 témoins, les DP présentent les caractéristiques suivant: minimum 64 ; maximum 178 400 ; Moyenne 34 352 et médiane 13680. L'âge médian des enfants était de 21 mois (minimum 1 et maximum 59 mois). Le sexe ratio (M/F) était 1,01. L'effectif de 120 enfants appelés cas c'est-à-dire ayant une température axillaires supérieure à 37°5 souffrant de paludisme et des 120 autres appelés témoins ont été sélectionnés au hasard suivant leur provenance et progressivement suivant leur ordre d'arrivée au centre de santé sur la liste des cas et témoins. Leurs mères ou gardiennes ont été soumises à un questionnaire.

I.2.1 Evaluation des variables chez les cas et les témoins selon les localités de provenance des enfants

Sur l'ensemble des parents d'enfants interrogés, 169 (70,4%) affirment que les enfants ont dormi sous MIILD la veille du jour de leur arrivée au centre de santé. Ce taux représente 70,8% (85 enfants) parmi les cas et 70,0% (84 enfants) parmi les témoins sans différence significative ($p = 0,8$). Lorsqu'on considère le statut des villages, le taux d'utilisation est de 68,0% dans la zone de forte résistance et 74,2% (69 enfants) dans la zone de faible résistance sans différence significative ($p=0,3$) (tableau XII). L'utilisation des moustiquaires imprégnées la veille de l'enquête, la fréquence d'utilisation des moustiquaires imprégnées au cours des deux semaines précédent le jour de l'enquête, la disponibilité en moustiquaire imprégnée au niveau du ménage, l'utilisation d'autres moyens de protection contre les piqûres de moustique sont les mêmes dans les deux groupes d'enfants (cas et témoins) ($p >0,05$) aussi bien en localités de faible ou de forte résistance des vecteurs. Par contre, la prévalence parasitaire, la splénomégalie et les moyennes géométriques des densités parasitaires, sont significativement plus élevées chez les cas que chez les témoins ($p<0,05$).

Le nombre d'enfants ayant leurs Gouttes Epaisse (GE) positives parmi les cas est de 39 soit 32,5% contre 16 soit 13,3% parmi les témoins. Ainsi, environ 1 enfant sur 3, a présenté une parasitémie positive chez ceux qui ont la fièvre.

Toutes les fièvres n'étant pas d'origine palustre, nous avons défini les fièvres attribuables au paludisme comme la présence d'une hyperthermie (température axillaire = 37,5°C) associée à la présence de *P. falciparum*. La prévalence globale du paludisme est de 32,5%.

Lorsqu'on considère les provenances des enfants, dans les clusters de forte résistance, la prévalence parasitaire est plus élevée chez les cas que les témoins ($p= 0,000$).

La moyenne géométrique des densités parasitaires est environ dix fois plus élevée chez les cas que chez les témoins dans les zones de faible résistance ($p=0,001$) et près de quatre fois plus élevée dans les zones de forte résistance des vecteurs sans différences significatives ($p=0,325$). Il en est de même de l'indice splénique qui en plus d'être plus important parmi les cas que les témoins ($p=0,000$) est aussi plus élevé en localités de forte résistance par rapport aux zones de faible résistance. Toutefois les moyennes géométriques des DP sont plus élevées en zone de forte résistance.

Tableau XII : Evaluation des variables épidémiologiques chez les cas et les témoins en fonctions des zones de forte et de faible résistance des vecteurs

Variables	Zone de Faible Résistance (R+)				P-value	Zone de forte résistance (R+++)				
	Cas		Témoins			Cas		Témoins		
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Utilisation MIILD										
Oui	11	24,4	13	27,1	0,771	24	32,0	23	31,9	0,994
Non	34	75,6	35	72,9		51	68,0	49	68,1	
Groupe d'âge										
9-23 mois	18	40,0	43	89,6	0,000	3	4,0	12	16,7	0,011
24-59 mois	27	60,0	05	10,4		72	96,0	60	83,3	
Disponibilité										
Oui	42	93,3	44	91,7	0,617	66	88,0	66	91,7	0,463
Non	03	6,7	4	8,3		9	12,0	6	8,3	
Utilisation d'autres moyens										
Oui	8	17,8	13	27,1	0,293	17	22,7	9	12,5	0,106
Non	37	82,2	35	72,9		58	77,3	63	87,5	

Fréquence utilisation MIILD									
Toujours	23	51,1	23	47,9		34	45,3	37	51,4
Souvent	8	17,8	10	20,9	0,757	17	22,5	8	11,1
Rarement	4	8,9	2	4,2		5	6,7	6	8,3
Jamais	10	22,2	13	27,1		19	25,3	21	29,2
Prévalence parasitaire	18	19,4	6	6,5	0,002	21	14,3	10	6,8
Splénomégalie	13	14,0	4	4,3	0,010	15	10,2	3	4,1
Moyenne géométrique des DP	103,4		2,641		0,0014	6,405		3,907	
									0,325

I.2.2 Facteurs associés à la présence de *Plasmodium falciparum* dans le sang de l'ensemble des enfants

Les résultats des analyses multivariées réalisées sur l'ensemble des variables supposées influencées la présence du parasite chez les enfants dans les différentes localités révèlent que, l'âge des enfants, la splénomégalie, l'utilisation d'autres moyens de prévention, la prévalence parasitaires, l'âge d'utilisation des MIILD établissent un lien avec la survenue du paludisme et sont présentés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Facteurs associés à la présence de *Pf* dans le sang des enfants de l'étude

Facteurs associés	Odds Ratio (95% C.I.)	Coefficient Bêta	S. E.	Test Wald	p-value
0 à 23 mois	-	-	-	-	-
24 à 59 mois	2,945(1,452;5,973)	1,08	0,361	8,962	0,003
Splénomégalie	0,102(0,044;0,237)	-2,284	0,432	27,967	0,000
Durée de MIILD	0,936(0,885;0,989)	-0,067	0,028	5,622	0,018
Utilisation d'autres moyens de protection	0,417(0,202;0,862)	-0,874	0,37	5,576	0,018
Infestation(GE)	3,47	1,244	0,503	6,113	0,013

C.I. : Intervalle de Confiance; S.E.: Ecart-Type

I.2.3 Efficacité protectrice des MIILD utilisées par les enfants

Pour l'ensemble des enfants, les témoins négatifs ont dormi sous moustiquaire imprégnée la veille de l'enquête de la même manière que les enfants souffrant de paludisme (69,23% *versus* 69,23%, OR= 1, IC 95% [0,45–2,22]. Dans les zones de faible résistance comme dans les zones de forte résistance, la fraction protectrice (EP=1-OR) est similaire (tableau XIV). On note l'effet de la couverture universelle en MIILD sans l'influence du niveau de la résistance des vecteurs.

Tableau XIV : Analyse de l'efficacité conférée par les MIILD chez les témoins négatifs et les enfants souffrants du paludisme

Variables	Cas +		Témoins -		OR	IC95%	EP	p
	n	%	n	%				
Utilisation des MIILD par l'ensemble								
Oui	27	69,23	72	69,23	1			
Non	12	30,77	32	30,77	1	0,45	2,22	0,0
Utilisation des MIILD en zone de faible résistance								
Oui	14	74,07	32	75,56	1			
Non	04	25,93	10	24,44	1,09	0,29	4,09	-0,09
Utilisation des MIILD en zone de forte résistance								
Oui	13	70,37	40	68,0	1			
Non	08	29,63	22	32,0	0,89	0,32	2,49	0,11
Efficacité Protectrice (EP=1-OR)								

I.2.4 Influence de la résistance sur les paramètres épidémiologiques des enfants dans l'étude

Les résultats des analyses réalisées avec les variables «utilisation des MIILD, la splénomégalie, la prévalence parasitaire» avec la variable «faible ou forte résistance des vecteurs» sont présentés dans le tableau XV.

Le modèle de régression logistique utilisé a montré que l'utilisation de moustiquaire imprégnée la veille de l'enquête est constante en localité de faible résistance qu'en localité de forte résistance. La splénomégalie et la prévalence parasitaire n'expliquent pas mieux l'effet de la résistance des vecteurs sur le paludisme chez les enfants de moins de 5 ans évalués au centre de santé au niveau des cas et des témoins.

Tableau XV : Analyse des paramètres associés aux statuts des villages de provenance des enfants

Source des variables	Paramètres	Modalités	Coefficient	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value
Cas	Utilisation des MIILD	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,3747	0,6875	[0,2982;1,5849]	0,3792
	Splénomégalie	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,4855	0,6154	[0,261;1,4509]	0,2672
	Prévalence parasitaire	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,539	0,5833	[0,2672;1,2736]	0,1761
Témoins	Utilisation des MIILD	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,2341	0,7913	[0,3532;1,7728]	0,5695
	Splénomégalie	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,7376	0,4783	[0,1022;2,2374]	0,3488
	Prévalence parasitaire	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	0,1214	1,129	[0,3814;3,3422]	0,8265
Ensemble Cas et Témoins	Utilisation des MIILD	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,301	0,7401	[0,4145;1,3212]	0,3087
	Splénomégalie	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,4719	0,6238	[0,3034;1,2827]	0,1995
	Prévalence parasitaire	R+	0,000	1,00	-	-
		R+++	-0,2636	0,7683	[0,4172;1,4148]	0,3975

I.2.5 Evaluation de la réponse IgG anti-salivaire spécifique

Nous avons évalué les niveaux des anticorps anti-gSG6-P1 contre le paludisme chez les enfants pour apprécier le niveau de leur exposition aux piqûres de moustiques. Dans cette partie, nous avons analysé et présenté les résultats des dosages d'IgG antigSG6-P1, par ELISA, de 240 individus (120 cas et 120 témoins constituant la population de cette étude). Il s'agit d'un nouvel outil biomarqueur, qui explique mieux les variations de l'exposition ou du contact homme-vecteur. Ces analyses ont été faites en tenant compte de l'utilisation des MIILD, du statut clinique des enfants, de la présence ou non du parasite, du statut des clusters retrouvés et des communes abritant les centres de santé ayant servi à la collecte des données.

I.2.5.1 Réponse IgG anti-salive selon le statut de faible ou de forte résistance des vecteurs et l'utilisation des MIILD par l'ensemble des enfants

Pour l'effet «résistance», nous avons comparé le profil des réponses IgG individuelles des sujets des clusters de faible résistance ($n = 93$; 38,75%) à ceux de forte résistance ($n = 130$;

61,25%), tous les âges confondus des enfants. L'évolution des niveaux médians d'IgG spécifiques entre les enfants était similaire (figure 17 a). Ceci suggérait que la résistance des vecteurs au niveau des clusters n'affecte pas la réponse IgG anti-salive et que les niveaux d'IgG spécifiques étaient similaires dans les deux groupes ($p=0,4146$). La figure 17b indique que le niveau médian des anticorps est semblable chez les enfants qu'ils utilisent ou pas de MIILD la veille de l'enquête ($p=0,7724$).

Dans cette étude, le sexe et surtout l'âge, facteurs majeurs de variations de la réponse immune adaptative, n'ont pas d'effet significatif sur le développement de la réponse Ac (IgG).

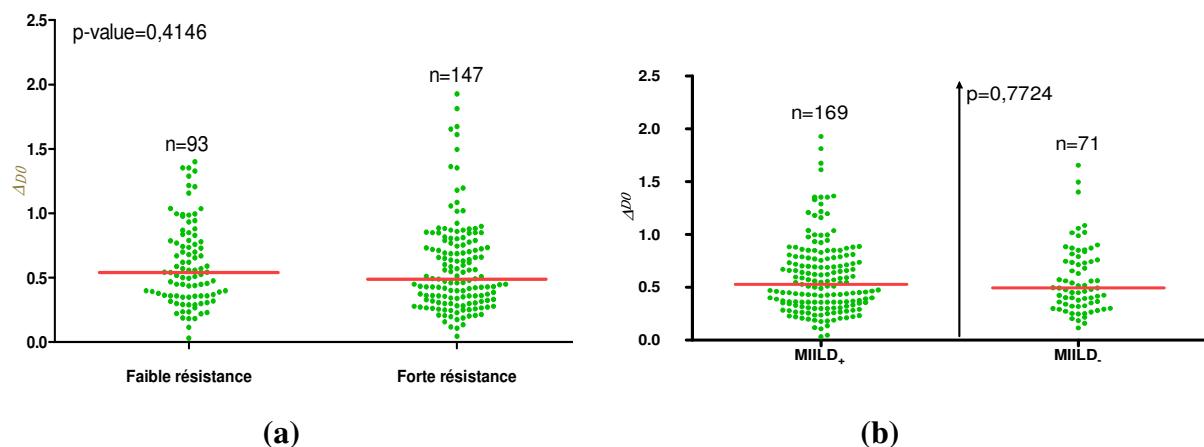


Figure 17 : Réponse IgG anti-salivaire totale chez 240 individus selon la zone de forte et de faible résistance et l'utilisation des MIILD

I.2.5.2 Réponse IgG anti-salive selon le statut infectieux des individus et les sites d'étude

Nous avons vérifié si les individus infectés par *P. falciparum* (seule espèce plasmodiale diagnostiquée lors de cette étude) présentaient différents profils ou niveaux de réponse IgG spécifiques à la salive totale d'*An. gambiae* différents. Pour ceci, nous avons pris l'ensemble des prélèvements puis comparé les niveaux d'IgG spécifiques entre les individus non infectés ($n= 185$) et les individus infectés par *P. falciparum* ($n= 55$). Les résultats de cette comparaison sont présentés dans la figure 18b.

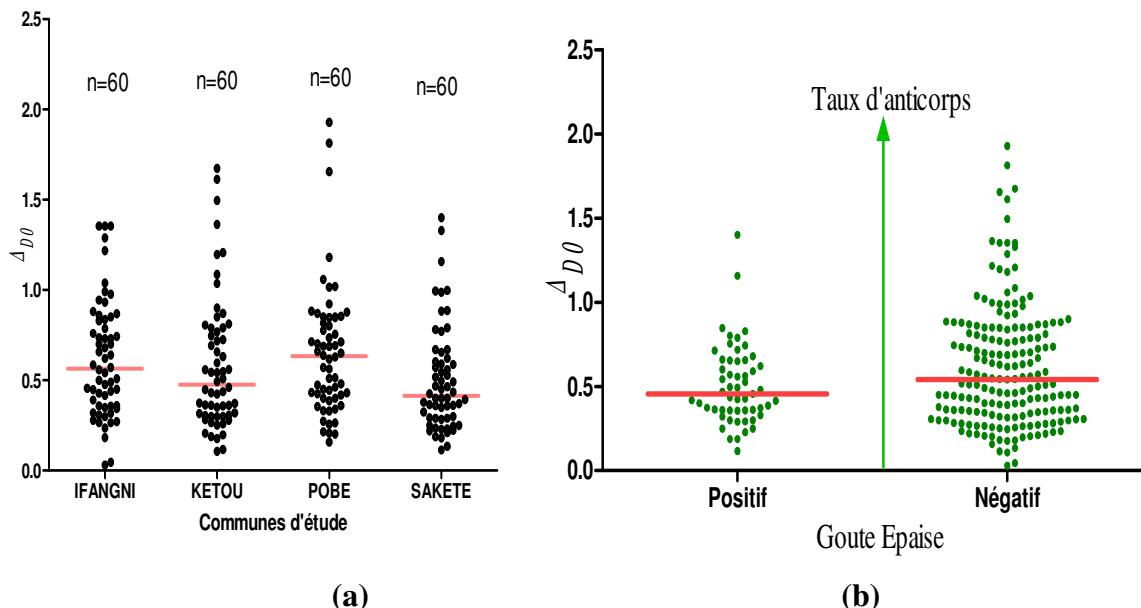


Figure 18 : (a, b) Réponse IgG anti-salivaire totale chez 240 individus suivant les sites et selon qu'ils soient infectés ou non

La figure 18a montre que le niveau médian d'IgG spécifiques à la salive totale d'*An. gambiae* n'était pas significativement plus faible chez les individus non infectés comparés à ceux qui étaient infectés par *P. falciparum* ($p= 0,1152$; test non paramétrique de Mann-Whitney).

De grandes variabilités ont été observées selon le site d'étude (figure 18a). Les médIANES du graphique à gauche indiquent bien que les niveaux d'exposition sont différents et positionnent Pobè comme commune ayant le niveau le plus élevé selon le test de Kruskal Wallis ($p=0,03$). De plus, les niveaux individuels d'IgG spécifiques des individus infectés étaient pour la plus part supérieurs à 0,250 (Seuil Réactionnel); ce qui n'était pas le cas de ceux des non infectés chez lesquels plusieurs DO (individuel) $< 0,250$ ont été observés.

I.2.5.3 Réponse IgG anti-salive selon le statut infectieux des individus et les sites d'étude

Les résultats des réponses IgG individuelles spécifiques à gSG6-P1 chez les cas et les témoins sont représentés par la figure 19. Aucune différence du niveau d'exposition n'a été observée chez les cas et les témoins selon le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides. Le test de Kruskal Wallis ($p=0,7724$) n'a noté aucune différence des niveaux d'exposition même avec l'utilisation des MIILD.

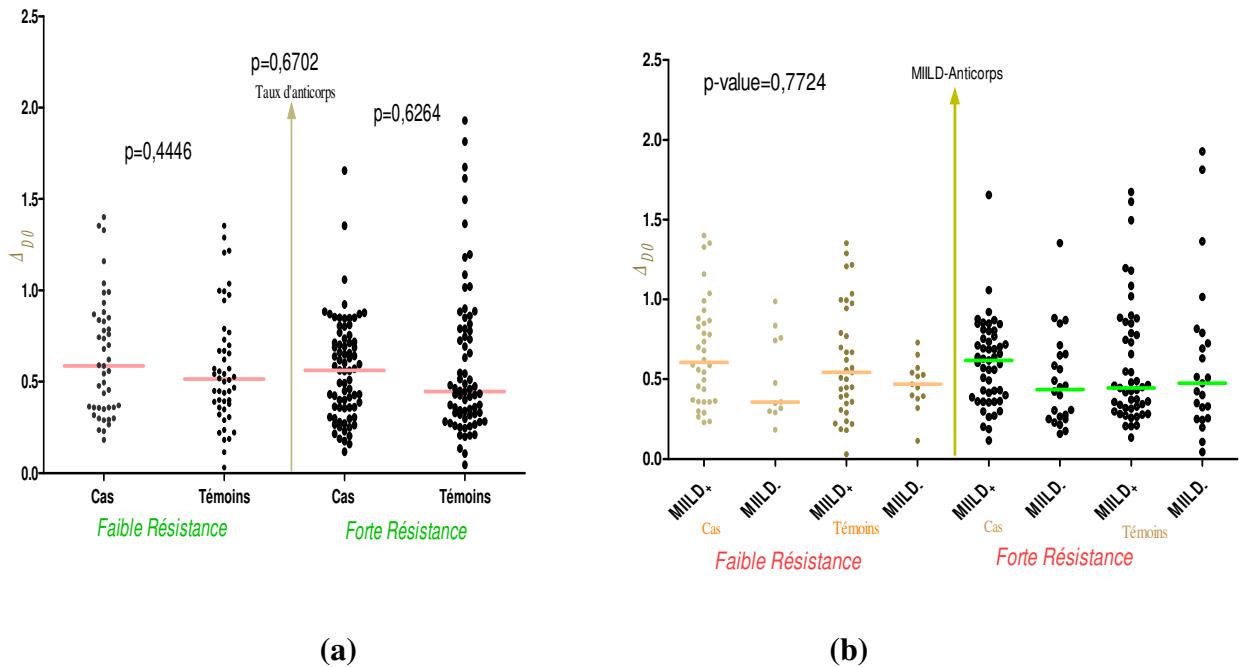


Figure 19 : (a, b) Réponse IgG anti-salivaire totale chez 240 individus suivant les cas et les témoins selon qu'ils aient utilisé ou pas de MIILD dans les deux types de localités

I.3. Discussion

Les indicateurs épidémiologiques évalués au niveau des centres de santé chez des enfants de moins de cinq ans n'ont pas permis de mettre en évidence l'impact de la résistance sur l'efficacité des MIILD. Les informations recueillies au niveau des quatre formations sanitaires ne constituent que des reflets de la situation qui normalement devrait être vue en population dans les conditions réelles d'utilisation des moustiquaires imprégnées dans des contextes de forte ou de faible résistance des vecteurs. L'efficacité protectrice attendue de l'utilisation des MIILD en accès universel contre la morbidité palustre chez les enfants de moins de 5 ans est évaluée sur la base des informations reçues des mères ou gardiennes d'enfants venues en milieu de soins pour solliciter les prestations des agents de santé. Toutefois, cette étude a permis de confirmer une fois de plus, la meilleure compréhension du paludisme maladie que devrait avoir les acteurs impliqués dans la prise en charge des cas. Si en continuant de voir les interventions en l'état, sans pour autant prendre en considération les exigences de l'environnement des vecteurs qui modifient leur comportement, le développement de la résistance par les vecteurs par exemple, on est en droite ligne pour avoir les résultats escomptés. Plusieurs des travaux de recherche réalisés après la mise en place des moustiquaires dans les populations ont étudié l'acceptabilité de ces moustiquaires, leur utilisation (Prakash *et al.*, 2008; Atkinson *et al.*, 2009; Toé *et al.*, 2009), leur efficacité

protectrice (Lengeler, 2004 ; Henry *et al.*, 2005, Rogier *et al.*, 2009; Damien *et al.*, 2010; Alyko, 2011 ; Kouadio, 2012), leur intégrité physique, la biodisponibilité de l'insecticide sur les tuiles de moustiquaires (Kilian, 2012 ; Gnaguenon *et al.*, 2013 ; Mutuku *et al.*, 2013) et leur perte ou leur augmentation d'efficacité en conditions contrôlées (N'guessan *et al.*, 2007 ; Asidi *et al.*, 2012 ; Briet *et al.*, 2013).

A notre connaissance, ce travail est l'un des premiers à faire le lien entre l'impact de la résistance des vecteurs sur des cas reçus au niveau des formations sanitaires et l'existence de la résistance au niveau des clusters de provenance des patients.

Elle a permis de comprendre que un cas de fièvre sur trois est d'origine palustre au niveau des formations sanitaires. Cette information est capitale pour les programmes de lutte et les gestionnaires des intrants de lutte contre le paludisme qui devront travailler à faire respecter les directives et les politiques de lutte contre le paludisme qui recommande la confirmation systématique des cas avant le traitement (PNLP 2011 ; WHO 2005, 2006, 2009 et 2010).

Qualité et validité des résultats de l'étude

Dans le domaine de la lutte antivectorielle, il a été montré par Rogier *et al.* (2009b) un modèle d'évaluation de l'utilisation des MIILD par une étude cas-témoins non appariés au niveau de la communauté pour mettre en évidence une baisse des accès palustres chez les utilisateurs de MIILD. Dans ce cas et selon la période, le niveau de couverture en MIILD et l'endémicité du paludisme, la possibilité de retrouver les enfants non fébriles est élevée pour bien constituer le bras témoin tels que le recommande l'OMS (WHO, 2010).

Afin de réduire les biais, chaque formation sanitaire a recruté les cas et les témoins au même moment. La possibilité de retrouver les enfants sans fièvre pour constituer la population témoins est plus faible en raison de la faible fréquentation des services de santé par les enfants apparemment sains. La fièvre étant le premier motif de consultation dans les formations sanitaires, la définition des cas et des témoins a été ainsi peu spécifique dans notre étude. En effet, il est bien connu que la symptomatologie de l'accès palustre simple est peu spécifique. Aussi sa meilleure définition est basée sur la présence de symptômes évoquant le paludisme associée à une densité parasitaire supérieure au seuil pyrogénique de parasitémie (Armstrong Schellenberg, 1994). Toutes les formations sanitaires identifiées pour abriter les travaux disposent de laboratoire et d'une équipe de garde et de permanence capable donc de confirmer par la GE et de procéder au recrutement des cas aussi bien la nuit comme le jour. Les travaux ont duré plus de huit mois pour que chaque équipe soit en mesure d'identifier 30 cas et 30 témoins et nous avons été obligé de faire déplacer les équipes pour réaliser des jours de

permanence dans les centres de santé d’arrondissement plus proche des villages d’étude et qui sont dans la même aire sanitaire du site d’étude.

Les questionnaires ont été administrés par des infirmiers formés à ne pas suggérer la réponse de la mère ou de la gardienne. La question de l’utilisation des MIILD la veille de l’enquête est celle utilisée par l’OMS dans toutes ses enquêtes. Les techniciens de laboratoire ont procédé au prélèvement de la GE et du confetti aussitôt que le cas ou le témoin est identifié.

Utilisation des moustiquaires imprégnées

Dans cette étude, l’utilisation des MIILD par les enfants de moins de cinq ans reçus dans les formations sanitaires est élevée, de l’ordre de 70%. Ceci serait lié au fait que l’enquête s’est déroulée après la campagne nationale de distribution des MIILD en accès universel. La même observation a été faite dans la même zone par Ossè *et al.* (2012) qui ont obtenu une utilisation de 80%. Il serait intéressant de noter aussi que le jeune âge (moins de 2 ans) et l’utilisation d’autres moyens de prévention contre les vecteurs du paludisme sont des facteurs déterminants la survenue de l’accès palustre. Il est clair devant ces faits qu’il faut accentuer la sensibilisation des populations à l’utilisation des moustiquaires pour maintenir les niveaux d’utilisation obtenus par les jeunes enfants surtout en saison sèche.

Notre évaluation montre que l’utilisation des moustiquaires imprégnées par les enfants (<5ans) reçus dans les formations sanitaires, cinq à dix mois après la campagne de juillet 2011 est similaire dans les zones de forte ou de faible résistance des vecteurs aux insecticides.

Efficacité protectrice des moustiquaires

Pour évaluer l’efficacité protectrice des MIILD, nous avons été obligés d’améliorer les définitions de cas et de témoins. Ainsi la définition des cas basée sur la présence de symptômes évoquant le paludisme (fièvre avérée) a été complétée par la goutte épaisse (GE) positive en respectant les recommandations de l’OMS (OMS, 2010) pour traiter l’accès palustre simple avec les combinaisons thérapeutiques à base d’artémisinine. Le témoin a été défini par l’absence de fièvre et une GE négative.

Dans notre étude, l’efficacité protectrice des moustiquaires est similaire dans les deux types de zone aussi bien chez les cas que chez les témoins. Les estimations d’efficacité des moustiquaires imprégnées qui sont de l’ordre de 50% en zone d’endémie où les anophèles sont sensibles aux insecticides (Lengeler, 2004) ne sont pas observées dans notre étude. Il est à noter que dans l’étude de Lengeler, ces mesures ont été réalisées lors d’essais de phase III (WHOPES) où, par définition, les conditions d’intervention et d’évaluation sont optimales (pratiquement tous les enfants dorment tous les jours sous moustiquaires imprégnées et celles-

ci sont en parfait état). Les taux d'utilisation obtenus dans la présente étude sont proches de ceux obtenus lors de l'évaluation de la campagne nationale qui en fait constituent des informations plus justes obtenues au sein des ménages (PNLP, 2012). Notre méthode d'évaluation n'a pas permis d'établir un lien entre l'utilisation des MIILD et le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides. Par ailleurs la résistance de *An. gambiae* aux insecticides pyréthrinoïdes dans la zone ne devrait pas être négligée. Il serait important d'avoir une zone résistante versus sensible pour mettre en évidence, l'impact de la résistance sur l'efficacité opérationnelle des interventions de lutte antivectorielle.

Evaluation du niveau d'anticorps anti-salivaires

Tout d'abord, les données de l'étude ont montré une forte hétérogénéité de la réponse IgG spécifique à ce peptide salivaire entre les individus, i) au sein des cas et des témoins, ii) entre les 4 sites d'étude ii) entre les différentes localités de provenance des enfants, chez ceux qui utilisent ou pas de MIILD ou même entre les individus ayant leur goutte épaisse positive ou pas. Ces observations suggèrent que dans ces localités, d'importantes différences de niveau de contact Homme-Vecteur constatées pourraient être influencées par plusieurs facteurs et les comportements individuels (Robert *et al.*, 2003a) et / ou le ménage. Par exemple, l'utilisation des MIILD (Geissbuhler *et al.*, 2007) ou les déplacements des populations d'une localité à une autre, où l'exposition plus élevée aux anophèles (Robert *et al.*, 2003b), peut augmenter / diminuer de manière significative la probabilité de contact entre les hôtes humains et les vecteurs du paludisme. Mais certains facteurs épidémiologiques tels que la co-infection génétique, les paramètres nutritionnels, ne pouvaient être exclus.

Les résultats du biomarqueur renforcent les résultats précédemment obtenus qui ont validé ce peptide salivaire d'*An. gambiae* comme biomarqueur pour évaluer le niveau d'exposition humaine aux vecteurs du paludisme dans différents contextes d'exposition et de la transmission du paludisme (Poinsignon *et al.*, 2009 ; Drame *et al.*, 2010; Poinsignon *et al.*, 2012). Les niveaux médians qui ne diffèrent pas suivant les niveaux de résistance des vecteurs et suivant les utilisateurs ou non des MIILD suggère que dans les localités, le niveau de disponibilité en MIILD est élevé et que les populations qui n'utiliseraient pas les MIILD ont d'autres moyens de protection tels que les bombes aérosol, les serpentins et autres. Toutefois, les résultats doivent être interprétés avec une grande retenue, vu le grand écart existant entre le nombre des enfants infectés et celui des non infectés et la faiblesse de l'échantillon des infectés ($n = 55$). Cette étude souligne ensuite la pertinence de l'utilisation de ce peptide marqueur biologique pour l'évaluation, de l'exposition de la population aux piqûres et

l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle comme il a été démontré dans d'autres localités (Drame *et al.*, 2012 & 2010). On a observé que les niveaux moyens d'exposition aux piqûres des vecteurs étaient significativement différents entre les communes et pourraient être dus au fait que les populations d'une localité ne fréquentent pas tous forcément, la formation sanitaire de référence de la zone. Les résultats immunologiques obtenus portant sur l'évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des MIILD confirment les données épidémiologiques qui n'avaient pas pu mettre en exergue de différence entre les deux catégories de localités. Les résultats des travaux sur l'évaluation de la transmission conduite dans la même période dans la zone d'étude dans une courte durée n'avaient pas noté de différence entre les localités de forte et de faible résistance (Sovi *et al.*, 2013a).

I.4. Conclusion

L'évaluation des indicateurs épidémiologiques au niveau des centres de santé chez des enfants de moins de cinq ans n'ont pas permis de mettre en évidence l'impact de la résistance sur l'efficacité opérationnelle de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action. La raison pourrait être liée au choix des zones R⁺ et R⁺⁺⁺. Le niveau de résistance en R⁺ est probablement assez élevé et globalement proche de celui de R⁺⁺⁺. Il semble qu'il y a un seuil de résistance qui est déjà atteint dans les deux zones.

II. Impact de l'utilisation des MIILD sur la prévalence de *Plasmodium falciparum* et de l'anémie chez les enfants de moins de cinq ans dans les zones de forte et de faible résistances des vecteurs aux insecticides

Des études récentes ont montré que la réduction des taux d'hémoglobine chez les enfants dans les zones endémiques a été créée par les infections paludéennes (Taylor & Hurd, 2001 ; Ferguson *et al.*, 2003). Or, il n'a pas été possible de séparer clairement les effets des parasites des conséquences de l'anémie et de la transmission vectorielle. La résistance est en plein essor et représente une véritable menace pour les interventions de lutte antivectorielle qui sont actuellement utilisées et dont la couverture élevée a conduit à d'excellents résultats. Mais il y a très peu de données à ce moment qui nous permettent de juger si cette résistance se traduit par la réduction des indicateurs du paludisme.

Par conséquent, il est important d'évaluer l'impact de la résistance du vecteur et de l'utilisation des MIILD sur la prévalence du paludisme et de l'anémie dans la communauté (**Article 6**).

Les objectifs de cette étude sont de :

- déterminer la sensibilité de *An. gambiae* à la deltaméthrine et la fréquence de la résistance *Kdr*,
- évaluer la prévalence de l'infection du paludisme,
- mesurer les taux d'utilisation des MIILD,
- évaluer la prévalence de l'anémie chez les enfants âgés de 06 à 59 mois, et
- comparer les différents indicateurs en zones de faible et de forte résistances des vecteurs aux insecticides.

Tokponnon *et al.* *Malaria Journal* 2014, **13**:76
<http://www.malariajournal.com/content/13/1/76>



RESEARCH

Open Access

Impact of long-lasting insecticidal nets on anaemia and prevalence of *Plasmodium falciparum* among children under five years in areas with highly resistant malaria vectors

Filémon T Tokponnon^{1,2,5,6*}, Aurore Hounto Ogouyémi³, Yolande Sissinto³, Arthur Sovi^{5,6}, Virgile Gnanguenon^{5,6}, Sylvie Cornélie⁷, Adicath Adéola Adéothy³, Razaki Ossé^{5,6}, Abel Wakpo³, Dina Gbénou⁴, Mariam Oke^{1,2}, Dorothée Kinde-Gazard², Immo Kleinschmidt⁸, Martin C Akogbeto^{5,6} and Achille Massougbedji³

II.1. Méthodes

II.1.1 Zone d'étude

32 villages ont été choisis dans les quatre communes du département du Plateau (figure 20).

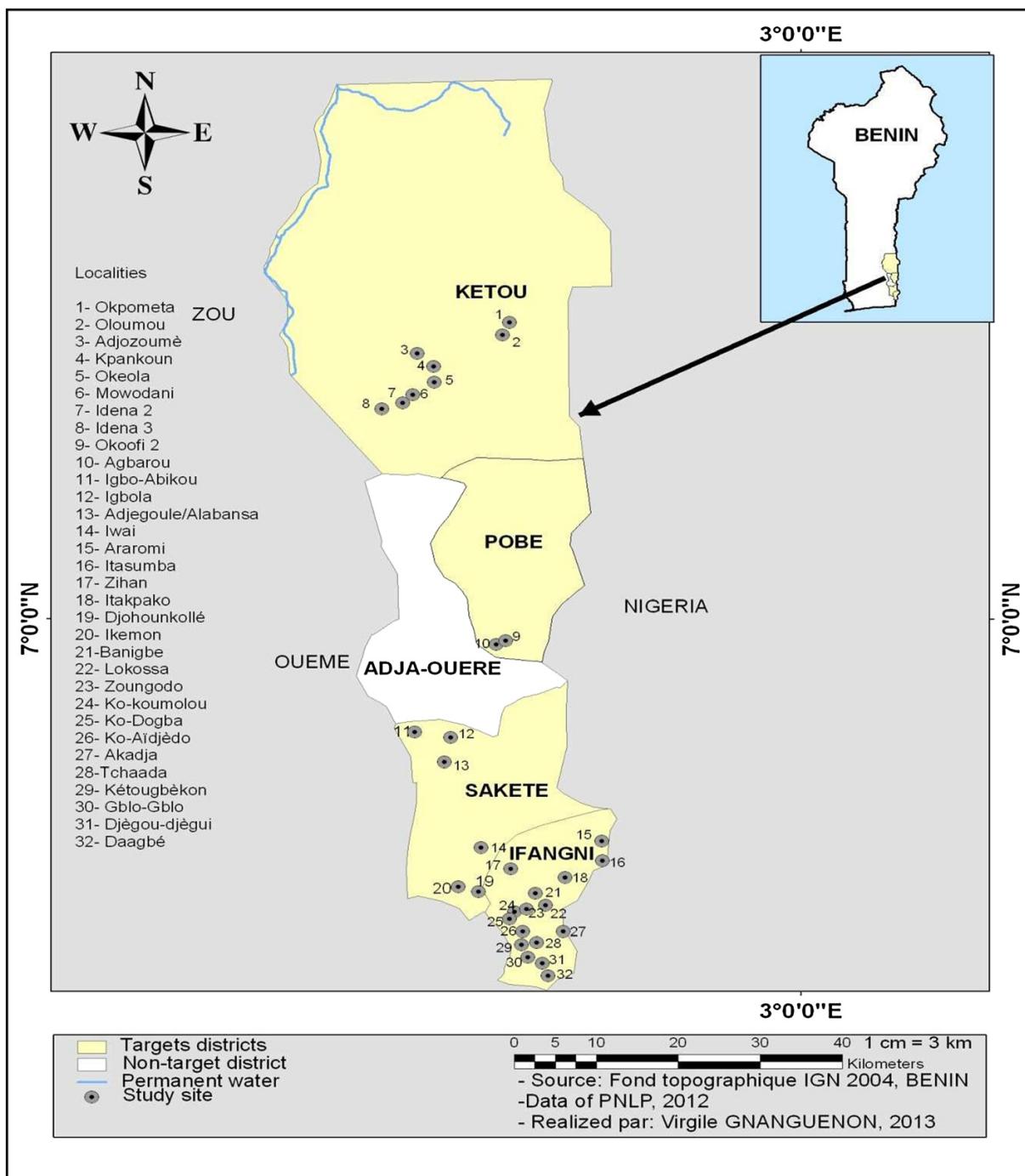


Figure 20: Carte montrant les villages de l'étude dans le département du Plateau

II.1.2 Conception de l'étude

Avant le début de l'étude, des tests de sensibilité de l'OMS ont été réalisés sur *An. gambiae* avec la deltaméthrine et les taux de mortalités observées ont été utilisées pour sélectionner les villages (grappes) où les activités ont eu lieu. Le tableau XVI montre la répartition des villages sur la base des mortalités observées avec la deltaméthrine en 2011. En raison de l'absence d'une zone où *An. gambiae* était totalement sensible aux pyréthrinoïdes au Bénin (Djègbè, communication personnelle), un critère a été utilisé pour classer le niveau de résistance. Nous avons appelé «zone R+++», une zone où le taux de mortalité observé était compris entre 0 et 60% et « zone R+ », une région où la mortalité observée variait entre 80-100%. Ces deux zones ont été identifiées sur la base de données sur la résistance collectées dans le département du Plateau (Djègbè, communication personnelle). Ainsi, 16 villages de forte résistance et 16 villages de faible résistance ont été choisis pour réaliser le travail. Nous pouvons noter que la plupart des villages inclus dans l'étude étaient situés dans la commune d'Ifangni et principalement les villages de faible résistance (tableau XVI).

Tableau XVI : Répartition des villages sur la base du statut de faible ou de forte résistance en 2011 selon les communes

Communes	IFANGNI (16)	SAKETE (06)	POBE (02)	KETOUE (08)
Villages	Itassoumba*	Iwai*	Okoofi2 [#]	Adjozoumè*
	Itakpako*	Igbola [#]	Agbarou*	Mowodani [#]
	Ko Koumolou*	Ikémon [#]		Idéna2 [#]
	Ko Aidjèdo*	Igbo-abikou [#]		Idena3 [#]
	Kétougbèkon*	Alabansa [#]		Kpankoun [#]
	Lokossa*	Djohounkollé*		Okpometa [#]
	Ko-Dogba*			Okeola [#]
	Zoungodo*			Oloumou*
	Zihan*			
	Araromi*			
	Daagbé*			
	Akadja [#]			
	Tchaada [#]			
	Banigbé centre [#]			
	Djégou-Djègi [#]			
	GbloGblo [#]			
	Zoungodo*			

*zone de faible résistance (R⁺) (80-100%); [#]zone de forte résistance (R+++)(0-60%).

Chaque village est composé de plusieurs hameaux et comprend un minimum de 100 enfants de moins de 5 ans. Des enquêtes transversales ont été menées dans chaque village entre mai et août 2012, pendant la période de haute transmission du paludisme. Dans chaque village, les enquêtes ont porté sur 40 enfants de moins de 5 ans et leur ménage. Les gouttes épaisses, les frottis sanguins et la mesure du taux d'hémoglobine ont été réalisés par des techniciens de laboratoire lors de l'enquête. Les résultats obtenus ont été analysés avec les données de résistance des vecteurs de la même période.

Les prospections larvaires d'*An. gambiae* s.l. n'étaient pas productives dans sept villages pendant la période d'étude pour observer le niveau de résistance des moustiques. Ces villages ont été exclus de l'analyse des données. Pour cela, le travail a été poursuivi dans 25 villages.

II.1.3 Collecte des données

II.1.3.1 Sensibilité d'*Anopheles gambiae* à la deltaméthrine

La détermination du niveau de résistance phénotypique a été effectuée en utilisant les tests de sensibilité comme décrit dans le chapitre 2.

II.1.3.2 Caractérisation des populations de *An. gambiae* par PCR: Espèces, forme moléculaire et mutation *Kdr* Leu-phe

Environ 16 à 126 femelles d'*An. gambiae* de chaque village issus des tests de sensibilité ont été analysés par PCR. L'ADN des moustiques témoins (non exposés) ont été extraits individuellement par la technique de CTAB. Les espèces et formes moléculaires du complexe *An. gambiae* ont été déterminées par PCR (Scott *et al.*, 1993 ; Favia *et al.*, 1997). La mutation *Kdr* a été déterminée par la technique HOLA décrite par Lynd *et al.* (2005).

II.1.3.3 Réalisation du frottis sanguin

La goutte épaisse et le frottis sanguin ont été effectués dans les villages par des techniciens de laboratoire à partir de sang prélevé par saignée après piqûre du doigt des enfants par des lancettes. Les lames ont été étiquetées après l'étalement puis séchées et stockées dans des boîtes de lames pour leur livraison au laboratoire.

II.1.3.4 Examen des lames au laboratoire

Les lames ont été ramenées au laboratoire pour une double lecture par des techniciens formés pour l'étude. Le diagnostic parasitologique a été fait grâce aux frottis sanguin et à la goutte épaisse colorés au Giemsa 10%. Les stades sexués de chaque espèce de *Plasmodium* ont été comptés dans le volume sanguin occupé par 200 leucocytes et la densité parasitaire a été

calculée en considérant 8000 leucocytes / μ litre de sang. Les frottis de chaque village ont été lus par le même technicien expérimenté, sous la supervision d'un parasitologue. Les lectures des deux techniciens effectuées sur le même ensemble d'échantillons de sang ont également été comparées. Leurs capacités de détection des parasites et d'estimation de la densité parasitaire ne différaient pas significativement. Un contrôle de qualité par contre-vérification a été effectué sur un échantillon choisi au hasard, soit 10% de tous les frottis.

II.1.3.5 Détermination du taux d'hémoglobine

La concentration d'hémoglobine (g/dL) a été déterminée par Hemo-Control EKF Diagnostic Analyser qui utilise du sang non dilué. Le cyanure de potassium utilisé dans la méthode de référence est remplacé par l'azoture de sodium. L'Hemo-contrôle utilise des fosses munis d'une courte partie lumineuse contenant trois réactifs: le désoxycholate de sodium, le nitrate de sodium, et l'azoture de sodium. Seulement 10 μ L de sang capillaire sont nécessaires. Lorsque le micro-bassin est rempli par capillarité, elle doit être adaptée pour tenir dans la partie Hemo-contrôle et plier l'onglet. Le taux d'hémoglobine est obtenu à l'intervalle de 25 à 60 secondes.

II.1.4 Analyses statistiques

Les données démographiques, biologiques et entomologiques ont été doublement saisies de façon autonome dans la base de données Epidata. Les analyses ont été faites à l'aide du logiciel SPSS16.0. Les données parasitologiques ont été analysées séparément en termes de prévalence de *P. falciparum* des formes sanguines asexuées de même que la densité de *P. falciparum* des formes sanguines asexuées dans les gouttes épaisses de parasites positifs. La prévalence des infections palustres asymptomatiques a été analysée comme une variable binomiale en utilisant un modèle de régression logistique.

Pour mesurer la force de l'association entre les facteurs explicatifs (utilisation de moustiquaires par les enfants la veille de l'enquête, statut de faible ou de forte résistance dans les villages), la prévalence de l'infection et la prévalence de l'anémie, le rapport de côte ou odds ratio (OR) a été calculé. Les fréquences alléliques de la mutation *Kdr* ont été comparées avec le logiciel GENEPOL. Les différences ont été considérées comme significatives pour p <0,05.

II.2. Résultats

II.2.1 Taux de mortalité, forme moléculaire et résistance knock-down de *An. gambiae*

La mortalité observée de la population de vecteurs exposés à la deltaméthrine a varié de 19 à 96% (tableau XVII). Les résultats ne permettent pas une répartition équitable des zones R+ et R+++ selon les critères de départ. Seulement trois des vingt-cinq villages positifs lors de la prospection larvaire obéissent au critère de R+++. Ainsi, dans le but d'uniformiser les analyses et d'avoir deux groupes de localités sur la base du niveau de résistance comme variable discriminatoire, la médiane du taux de mortalité a été déterminée. Le taux de mortalité médian était de 79% [74,0-83,9] IC 95% (tableau XVII). En conséquence, 12 localités de forte résistance et 13 localités de faible résistance ont été distingués.

Tableau XVII : Résultats des données phénotypiques spécifiques de 2012 et des fréquences *Kdr* des villages

Villages	Statut de résistance	N exposés	N morts après 24h	Mortalité (%)	Taille échantillon (2n)	Fréquence <i>Kdr</i> (%)
Banigbé	R+++	123	24	19,51	102	74,5
Kokoumolou	R+++	172	96	55,81	80	63,8
Agbarou	R+++	211	126	59,72	72	65,3
Araromi	R+++	141	89	63,12	98	61,2
Ko-Dogba	R+++	277	181	65,34	124	68,5
Mowodani	R+++	118	86	72,88	24	66,7
Igbo-Abikou	R+++	194	143	73,71	60	76,7
Idena3	R+++	199	147	73,87	126	68,3
Alabansa	R+++	192	142	73,96	100	72,0
Tchaada	R+++	225	167	74,22	98	83,7
Adjozoume	R+++	251	188	74,90	74	66,2
Iwaï	R+++	45	35	77,78	46	63,0
Total (R+++)		2148	1424	65,40		69,1
Djohounkolé	R+	257	203	79,00	112	69,6
Kétougbékon	R+	349	278	79,66	58	62,1
Lokossa	R+	327	261	79,82	114	65,8
Itakpako	R+	297	238	80,13	42	54,8
Igbola	R+	196	159	81,12	54	77,8
Ita-soumba	R+	352	290	82,39	48	66,7
Ko-Aïdjedo	R+	302	250	82,78	46	52,2
Zihan	R+	342	287	83,92	70	38,6
Gblo-Gblo	R+	50	42	84,00	40	62,5
Okéola	R+	481	430	89,40	104	74,0
Idena2	R+	651	618	94,93	138	69,6
Kpankoun	R+	50	48	96,00	16	50,0
Daagbe	R+	26	25	96,15	28	60,7
Total (R+)		3680	3129	85,33		61,8

Les fréquences *Kdr* ont été de 38-84% (tableau XVII). L'ensemble des *Anopheles gambiae* s.l. collectés était *An. gambiae* s.s (100%). Les résultats de l'identification des formes moléculaires ont montré que les formes M et S étaient présentes en sympatrie dans la plupart des villages (figure 21). Les *An. gambiae* s.s collectés dans les villages de Gblo-gblo et Tchaada étaient uniquement de la forme M. Certains hybrides M/S de *An. gambiae* s.s ont également été trouvés dans plusieurs villages (figure 21). La mutation *Kdr* a été trouvé à la fois chez les formes moléculaires M (67,73%) et S (66,34%) d'*An. gambiae* s.s mais leurs fréquences variaient selon les villages (36 à 84% chez M et 25-100% chez S). La forme S a été trouvée en très faible proportion (figure 21).

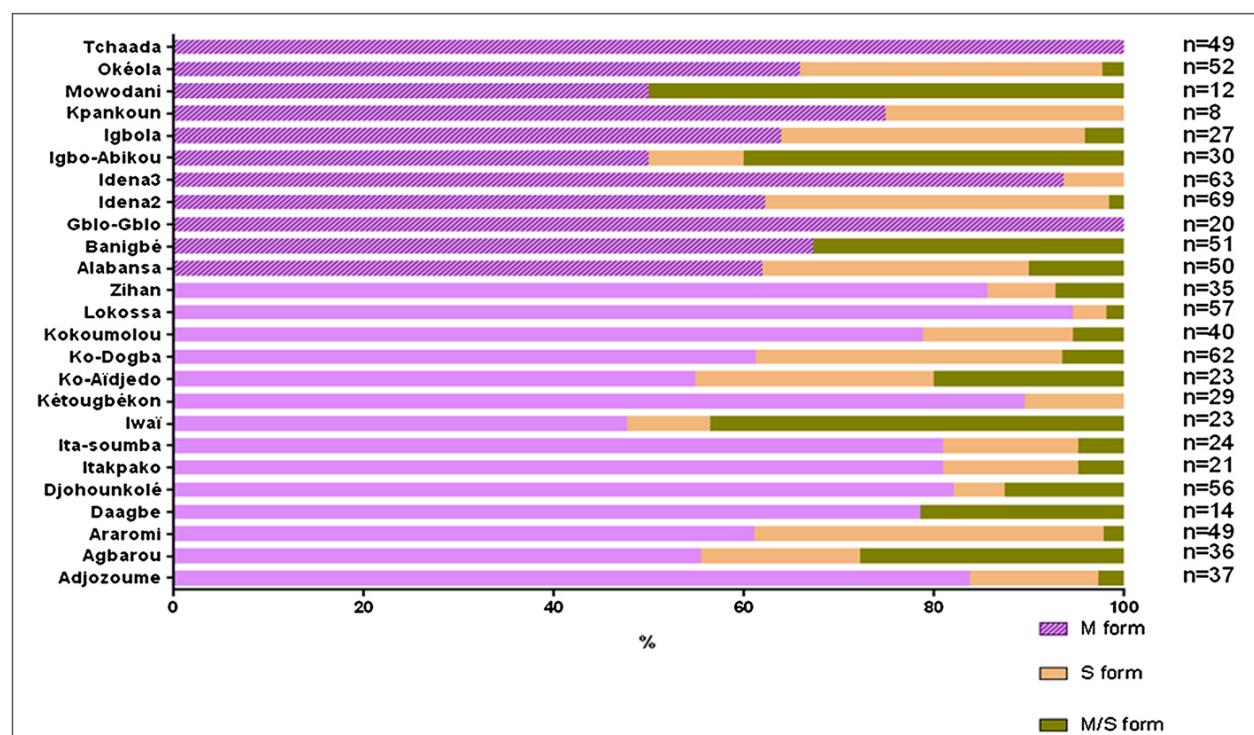


Figure 21 : Formes moléculaires de *An. gambiae* collecté par village

II.2.2 Description de la population, de l'utilisation des moustiquaires, de la prévalence de l'infection et de l'anémie

Un total de 1000 enfants âgés de 6 à 59 mois sélectionnés dans les 25 villages ont été testés pour l'infection au *P. falciparum*. Dans chaque village (de forte ou de faible résistances), environ 40 enfants ont été sélectionnés. L'âge moyen des enfants inclus dans cette étude a été de 27 mois. Dans les zones de faible résistance, la moyenne d'âge était de 26 mois contre 28 mois dans les zones de forte résistance (tableau XVIII). Parmi les ménages sélectionnés dans les 25 villages, 89% ont au moins une MIILD. 71% des enfants suivis dormaient sous MIILD

la nuit avant l'enquête. Dans la zone de faible résistance, la proportion d'enfants qui dormaient sous MIILD était de 74% contre 68% dans la zone de forte résistance (tableau XVIII).

Tableau XVIII : Caractéristiques des enfants utilisés dans l'analyse et de tous les enfants testés de l'enquête

	Zone de faible résistance (13 villages)	Zone de forte résistance (12 villages)
Nombre d'enfants	520	480
Prévalence du paludisme (%)	27,1 (23,5-31,1)	17,3 (14,2-20,9)
Age moyen (mois)	26,5 (25,3-27,8)	28,4 (27,3-29,6)
Dormis sous MIILD (%)	74,1 (70,1-77,6)	68,0 (63,6-71,9)
Taux moyen d'hémoglobine	9,5 (9,4-9,7)	9,2 (9,1-9,3)

La prévalence de l'infection du paludisme observé chez les enfants de moins de 5 ans dans la communauté a été de 22,4% [19,9-25,1] (tableau XIX). Cette prévalence a été de 17,3% [14,2-20,9] dans les zones de forte résistance et de 27,1% [23,5-31,1] dans les zones de faible résistance ($p=0,04$). Il y a plus d'infection au *P. falciparum* dans les zones de forte mortalité à la deltaméthrine. Toutefois, les villages pris séparément n'ont montré aucun lien entre la prévalence de l'infection au *P. falciparum* et la mortalité à la deltaméthrine (figure 22).

Tableau XIX : Prévalence de *P. falciparum* dans les zones de faible et de forte résistance

Villages	Statut de résistance	Nombre de goutte épaisse	Nombre de goutte épaisse positive	Prévalence du <i>P. falciparum</i> (%)
Banigbe	R+++	40	10	25,0
Kokoumolou	R+++	40	6	15,0
Agbarou	R+++	40	4	10,0
Araromi	R+++	40	9	22,5
Ko-Dogba	R+++	40	13	32,5
Mowodani	R+++	40	6	15,0
Igbo-Abikou	R+++	40	9	22,5
Idena3	R+++	40	11	27,5
Alabansa	R+++	40	7	17,5
Tchaada	R+++	40	2	05,0
Adjozoume	R+++	40	4	10,0

Iwaï	R+++	40	2	05,0
Total (R+++)		480	83	17,3
Djohounkolé	R+	40	6	15,0
Kétougbékon	R+	40	4	10,0
Lokossa	R+	40	13	32,5
Itakpako	R+	40	22	55,0
Igbola	R+	40	15	37,5
Ita-soumba	R+	40	23	57, 5
Ko-Aïdjedo	R+	40	9	22,5
Zihan	R+	40	18	45,0
Gblo-Gblo	R+	40	15	37,5
Okéola	R+	40	3	7,5
Idena2	R+	40	5	12,5
Kpankoun	R+	40	5	12,5
Daagbe	R+	40	3	7,5
Total (R+)		520	141	27,1

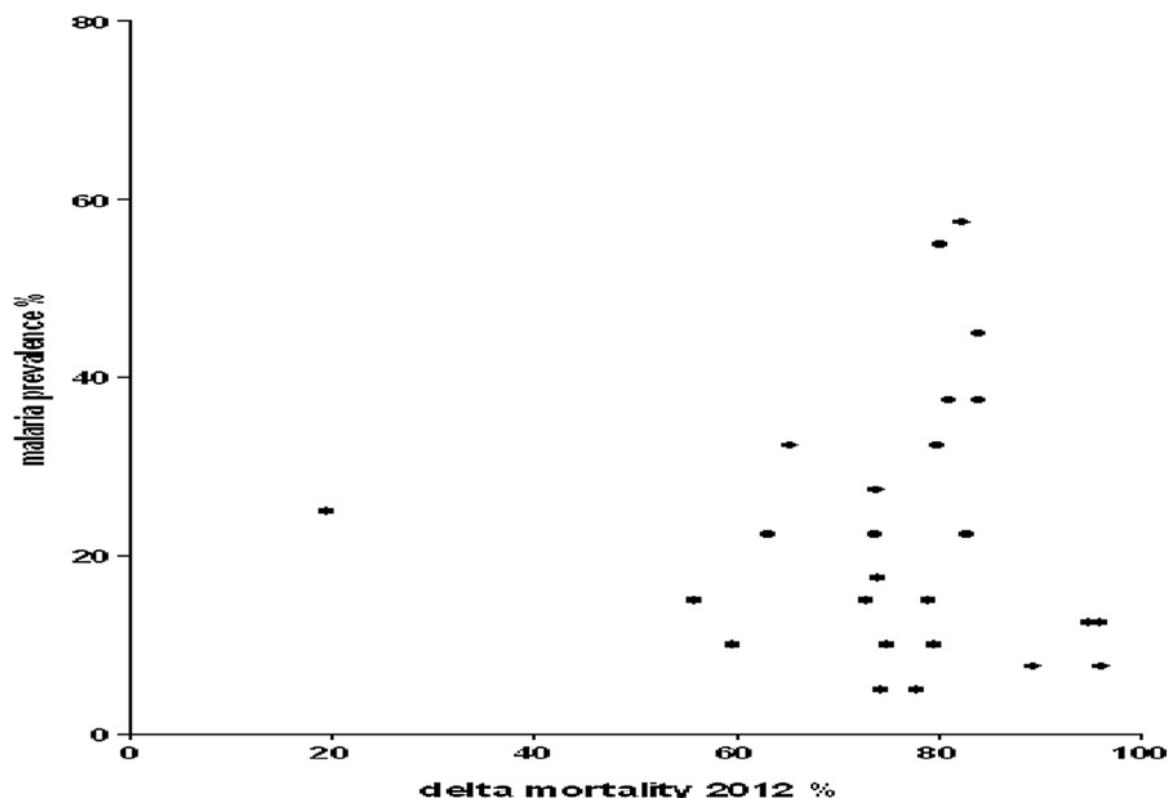


Figure 22 : Prévalence du paludisme pour chaque village en fonction du niveau de résistance (mortalité de *An. gambiae* à la deltaméthrine)

Le taux moyen d'hémoglobine chez les enfants a été de 9,4g/dL [9,3 -9.5] sans variation d'une localité à l'autre (tableau XVIII). Le tableau V décrit les taux d'hémoglobine chez les enfants âgés de 6-59 mois dans les zones de forte et faible résistances. Sur les 1000 enfants évalués, 77% étaient anémiés. Huit enfants sur dix qui ont 6-30 mois contre sept sur dix âgés

de 31-59 mois présentaient une anémie (tableau XX). L'anémie observée chez les enfants de 6-30 mois est significativement plus élevée que celle des enfants âgés de 31-59 mois ($p = 0,00$) mais aucune différence associée aux zones de résistance n'a été observée ($p = 0,35$).

Tableau XX : Répartition du taux d'hémoglobine des enfants entre les zones de faible et de forte résistance

Taux d'hémoglobine <11 g/dl				
Age (mois)	Zone de faible résistance		Zone de forte résistance	
	Nombre (%)	Population totale	Nombre (%)	Population totale
[6–30] mois	244 (80,3)	304	256 (86,5)	296
[31–59] mois	146 (67,8)	216	143 (77,7)	184
Total	390 (75,0)	520	399 (83,1)	480

Pour l'âge: $p = 0,00$ Pour la zone de résistance: $p = 0,35$

II.2.3 Effet de la résistance sur l'efficacité des MIILD

Le risque d'avoir le paludisme a été significativement plus élevé chez les enfants qui ne dorment pas sous MIILD que chez les enfants qui dorment sous MIILD dans les deux zones (tableau XXI). Mais la prévalence du paludisme a été plus élevée chez les enfants qui ont utilisé des MIILD dans la zone de faible résistance que dans la zone de forte résistance. Un résultat similaire a été observé avec les enfants qui n'ont pas utilisé les MIILD dans les deux zones. Le risque d'avoir le paludisme a été réduit de manière significative ($p <0,05$) avec l'utilisation des MIILD tant dans les zones de forte et de faible résistances. L'effet préventif des MIILD dans la zone de forte résistance a été de 60% (95% IC : 40-70), et a été significativement plus élevé que ce qui a été observé dans la zone de faible résistance (40% 95% IC : 30-60) ($p <0,05$).

Tableau XXI : Effet de la résistance sur l'efficacité des MIILD exprimé par la prévalence de l'infection à *P. falciparum* chez les enfants de 0 à 5ans

			Total positif	Total testé par microscope	Prévalence du <i>P. f</i> (%)	Utilisation MIILD	Effet de la résistance sur l'efficacité
Faible résistance	MIILD	Non	46	124	37,1 (36,3-38,0)	1	
		Oui	89	356	25,0 (24,6-25,5)	1,8 (1,1-2,8) p = 0,00	1
Forte résistance	MIILD	Non	46	166	27,7 (27,0-28,4)	1	
		Oui	43	354	12,1 (11,8-12,4)	2,8 (1,7-4,5) p = 0,000	0,4 (0,3 0,6) p = 0,000

Le tableau XXII montre que l'utilisation des MIILD a réduit la prévalence de l'anémie aussi bien dans les zones de faible résistance aux insecticides que dans les zones de forte résistance. L'anémie a été significativement plus élevée chez les enfants qui ont l'habitude de dormir sous les MIILD comparativement aux enfants qui ne les utilisent pas dans les zones de faible résistance ($p= 0,02$). Dans la zone de forte résistance, le risque n'a pas été significatif ($p= 0,67$). La prévalence de l'anémie associée à l'utilisation des MIILD a été significativement plus élevée dans la zone de faible résistance que dans la zone de forte résistance ($p= 0,000$).

Tableau XXII : Effet de la résistance sur l'efficacité des MIILD exprimé par la prévalence de l'anémie chez les enfants de 0 à 5ans

Zone de résistance	Utilisation MIILD	Anémie (+)	Anémie (-)	Total	Prévalence de l'anémie (%)	Odds ratio MIILD non utilisé versus utilisé	Odds ratio forte versus faible résistance
Faible résistance	Non	54	19	73	74,0	1	
	Oui	345	62	407	84,8	0,5 (0,3-0,9)	1
Total faible résistance		399	81	480	83,1		$p = 0,02$
Forte résistance	Non	85	26	111	76,6	1	
	Oui	305	104	409	74,6	1,1	1,9 (1,3-2,7)
Total forte résistance		390	130	520	75,0		
Total		789	211	1000	78,9	$p = 0,67$	$p = 0,000$

II.3. Discussion

Les résultats de l'efficacité des MIILD sur la prévention du paludisme en zone de résistance des vecteurs aux insecticides ont montré que dans notre étude, la résistance n'a pas réduit l'efficacité des MIILD. Paradoxalement, la prévalence de l'infection et de l'anémie sont plus élevées en zone de faible résistance, ce qui est en contradiction avec les résultats attendus. *Anopheles gambiae*, le principal vecteur du paludisme en Afrique, a développé une forte résistance aux pyréthrinoïdes dans le sud du Bénin (Ranson *et al.*, 2009). Cette résistance a été observée non seulement dans les zones urbaines et dans les zones caractérisées par la culture du coton, mais aussi dans les zones rurales où l'agriculture traditionnelle ne nécessite pas l'utilisation d'insecticides ou d'engrais agricoles (Akogbéto *et al.*, 2005 ; Djogbénou *et al.*, 2010 ; Yadouleton *et al.*, 2011). Le principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes observé au sud du Bénin est basé sur la modification de la cible chez les vecteurs. Contrairement à ce qui est observé dans certains pays africains comme le Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2002), cette résistance est élevée chez *An. gambiae* forme M et forme S. La forme M était la forme majoritaire au sud du Bénin en général et en particulier dans notre zone d'étude. Ces résultats confirment ceux de Yadouléton *et al.* (2010) qui indiquent que la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides augmentait de plus en plus au Bénin.

Afin de déterminer l'influence de la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des MIILD, l'évolution de la résistance des vecteurs dans la zone d'étude a été suivie. Les résultats de l'enquête ont montré que la résistance phénotypique a fortement varié au cours du temps lorsqu'elle est comparée avec les données de 2011 confirmant ainsi les résultats de Akogbéto *et al.*, 2005. Cette variation a abouti à des recommandations pour la classification des villages par le comité de l'OMS. En effet, la valeur médiane de la mortalité à la deltaméthrine a été utilisée pour le regroupement des villages de forte et de faible résistance. La valeur médiane de la mortalité dans cette étude a été de 79%. Cela suggère que la mortalité induite par la deltaméthrine a diminué. Donc, la sensibilité des vecteurs à la deltaméthrine apparaît comme un phénomène dynamique qui pourrait être influencé soit par des paramètres intrinsèques et extrinsèques tels que, les conditions climatiques, les facteurs écologiques ou les saisons.

La mutation *Kdr* est responsable de la résistance aux pyréthrinoïdes, mais les mécanismes de détoxication sont également impliqués. Jusqu'à présent, nous ne savons pas quelle est la part de chaque mécanisme dans les résistances phénotypiques observés dans cette étude. Les résultats de la mutation *Kdr* ont montré qu'il y a eu une différence significative entre les villages de forte et de faible résistance en 2012. Les fréquences de cette mutation sont significativement plus faibles dans la zone de faible résistance que dans la zone de forte

résistance. La mutation a également été observée tant chez la forme M que la forme S. Ceci pourrait être expliqué par une pression de sélection élevée du gène *Kdr* dans les populations vectrices de terrain. Ces résultats sont similaires à ceux de Dabiré *et al.* (2008) et de Czéher *et al.* (2008) qui ont montré la présence de la mutation *Kdr* chez les deux formes moléculaires M et S d'*Anopheles gambiae*. En outre, nous n'avons pas observé de corrélation entre la résistance phénotypique (sensibilité à la deltaméthrine) et la résistance génotypique. Les mécanismes métaboliques impliqués dans la résistance des pyréthrinoïdes sont présents au Bénin (Djouaka *et al.*, 2008 ; MS/PNLP/CREC, 2011 ; Djouaka *et al.*, 2011), des études complémentaires sur ces gènes pourraient être menées pour répondre à cette question.

La couverture des ménages en MIILD chez les enfants en provenance de cette étude (88%) et le taux d'utilisation des MIILD chez ces enfants (71%) ont été meilleures. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre la couverture et l'utilisation des MIILD dans les deux zones (R+ et R++). Ainsi, les deux bras sont homogènes et ces facteurs n'affectent pas l'analyse des résultats.

La prévalence de la parasitémie dans cette population d'étude est de 22%, et les variations ont été notées entre les villages (5,0 à 57,5). Elle a été inférieure à la prévalence de 44,4% enregistrée chez des enfants de moins de 5 ans lors de l'enquête d'évaluation des indicateurs du paludisme menée dans la même région en 2010 par le PNLP (PNLP/MS, 2011). Ces taux de prévalence sont similaires à ceux observés par Pond (2013) chez les enfants vivant dans des communautés rurales éloignées de 150 km de la ville ou dans la même zone d'endémicité palustre en Afrique sub-Saharienne. La diminution de la prévalence des parasites du paludisme peut être due à des mesures de contrôle mises en œuvre récemment par le gouvernement du Bénin à travers le Ministère de la santé publique (PNLP/MS, 2012). Ces mesures comprenaient une distribution gratuite à l'échelle nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MIILD) à travers le territoire national (Tokponnon *et al.*, 2013). Cette baisse de la charge du paludisme attribué à l'utilisation d'interventions telles que les moustiquaires imprégnées a également été signalée dans les pays où le paludisme est endémique, comme le Kenya (Okiro et Snow, 2010).

La prévalence de l'anémie dans cette population de jeunes enfants est de 78,9%, presque identique aux taux rapportés (79%) dans la région selon l'enquête sur les indicateurs du paludisme menée en 2010 (PNLP, 2012). La variation de la prévalence de l'anémie observée dans la présente étude n'a pas montré de corrélation avec le niveau de résistance comme attendue. Le niveau de l'hémoglobine (<11g/dL) utilisé comme indicateur de l'anémie n'a pas

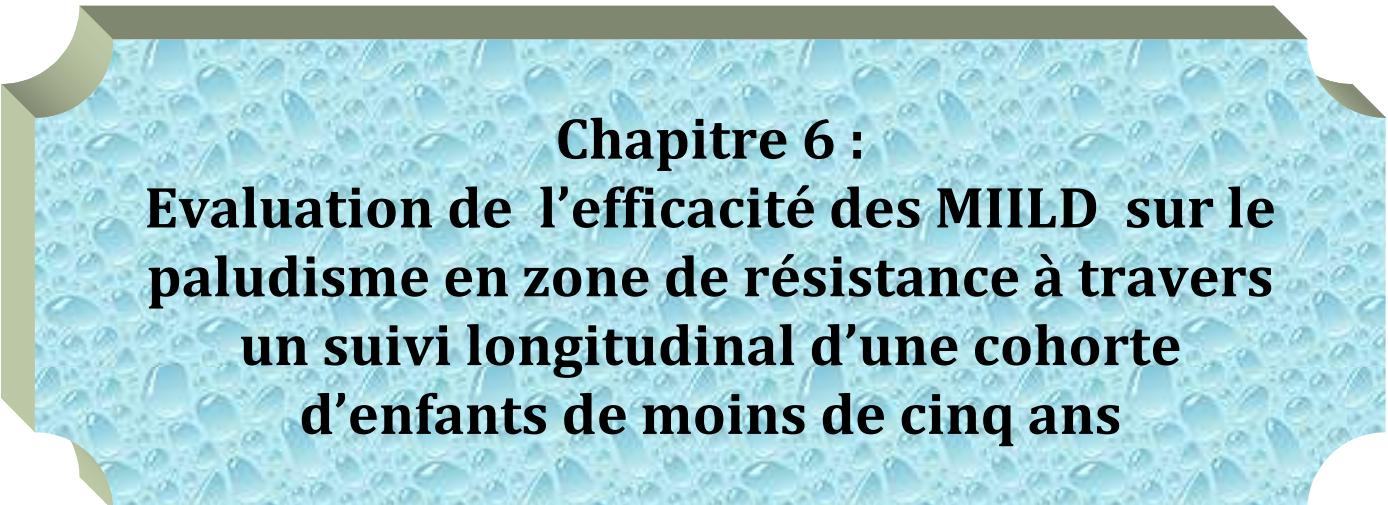
été significativement influencé par la résistance des vecteurs aux insecticides. Achidi *et al.* (2012) au Cameroun ont montré que la différence de la prévalence de l'anémie n'est pas une surprise dans leurs localités d'étude. Elle pourrait refléter la baisse de l'état nutritionnel des enfants.

Dans cette étude, l'efficacité des MIILD dans la prévention du paludisme a été significativement plus élevée dans la zone de forte résistance. La prévention de l'anémie par l'utilisation de MIILD était également plus élevée dans les zones de forte résistance. Selon une récente étude sur la transmission du paludisme dans la zone d'étude (Sovi *et al.*, 2013), la densité des vecteurs était très élevée dans la zone à faible résistance. Ces auteurs ont noté dans la zone de faible résistance un TIE élevé de 184,5 piqûres infectées/homme/6 mois contre 66,7 piqûres infectées/homme/6 mois ($p < 0,001$) dans la zone de forte résistance. De même, la prévalence de l'infection du paludisme a été de 27,1% dans la zone de faible résistance contre 17,3% en zone de forte résistance. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée entre la prévalence de l'anémie dans les deux zones. Le niveau élevé de transmission obtenu dans la région devrait donc conduire à un plus grand nombre de cas de paludisme. Les résultats d'une étude récente (Emami *et al.*, 2013) suggèrent que l'alimentation des moustiques sur des hôtes humains, dont le sang a été appauvri en raison d'une anémie sévère, n'a pas réduit de façon significative la capacité ou le potentiel de transmission des vecteurs du paludisme, et indique que les moustiques peuvent être en mesure d'exploiter le peu de ressources de sang à faible taux d'hémoglobine plutôt que celle qui est normale pour se reproduire.

Pour une bonne évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des MIILD, il serait souhaitable d'avoir deux zones franchement différentes sur le statut de sensibilité des vecteurs: l'une où l'anophèle est résistant et l'autre où il est totalement sensible. De plus, les deux zones doivent avoir les mêmes caractéristiques écologiques. Malheureusement, la forte augmentation de la résistance des vecteurs au sud du Bénin ne nous a pas permis d'obtenir ces zones et c'est ce qui constitue la principale limite de cette étude. Une autre limite de cette étude est la conception de l'étude transversale. Les associations présentées auraient pu être confondues par des facteurs non mesurés, et donc les causes des interférences ne peuvent pas être établies. Par ailleurs, la relation temporelle entre les variables d'exposition (évolution de la résistance des vecteurs, efficacité de l'utilisation des MIILD) et les résultats d'intérêt (apparition des cas de paludisme et d'autres facteurs associés) ne peut être observée.

II.4. Conclusion

Dans la zone d'étude, la résistance des vecteurs du paludisme semble à ce jour ne pas influer sur l'impact des MIILD. De plus, l'utilisation des MIILD a été fortement associée à une réduction de la prévalence du paludisme indépendamment de la résistance. Le résultat surprenant de la faible prévalence de l'anémie dans les zones de forte résistance serait probablement dû à la baisse de l'état nutritionnel des enfants et à des différences dans la bioécologie des populations de moustiques. Il devrait y avoir d'autres études pour suivre dans le temps, l'évolution des indicateurs épidémiologiques chez les enfants de même âge en communauté pour mettre en évidence l'impact réel de la résistance sur l'efficacité des MIILD.



Chapitre 6 :
Evaluation de l'efficacité des MIILD sur le
paludisme en zone de résistance à travers
un suivi longitudinal d'une cohorte
d'enfants de moins de cinq ans

Les avantages des MIILD du point de vue de leur efficacité à grande échelle n'est plus à démontrer. Elles constituent non seulement à la fois une barrière physique et chimique entre l'homme et les moustiques mais aussi procure un effet de masse lorsque son utilisation est en couverture universelle (Killeen *et al.*, 2007).

En effet, plusieurs travaux ont montré la réduction du nombre de cas et du nombre de décès dûs au paludisme en lien avec l'utilisation des MIILD en communauté (Howard *et al.*, 2000; Damien *et al.*, 2010; Binka *et al.*, 1998).

Malheureusement, l'obstacle majeur avec l'utilisation des MIILD, se trouve être le développement de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes. Par ailleurs, des travaux ont montré en phase II et III des baisses d'efficacité en lien avec la résistance des vecteurs (N'guessan *et al.*, 2007 ; Asidi *et al.*, 2012). Il est donc impérieux pour les PNLP de savoir s'ils doivent continuer à compter pendant longtemps sur ces outils de lutte qui ont montré leur efficacité.

C'est face à cette préoccupation que le présent chapitre a pour but d'évaluer l'effet de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des MIILD dans des localités de forte et de faible résistance des vecteurs aux insecticides à partir des données épidémiologiques obtenues à travers un suivi actif longitudinal des enfants de moins de 5 ans . Spécifiquement, il s'agit de :

- déterminer les niveaux de résistance des vecteurs à partir des taux de mortalité à la deltaméthrine au début, en période de forte transmission et à la fin de l'étude;
- mesurer l'incidence palustre et les densités parasitaires chez les enfants âgés de 06 à 59 mois ;
- évaluer la proportion d'enfants suivis infestés par le *Plasmodium falciparum*;
- mesurer l'efficacité protectrice des MIILD chez les enfants âgés de 06 à 59 mois dans les différentes zones de résistance;
- identifier les facteurs influençant l'infestation palustre chez les enfants âgés de 06 à 59 mois dans les clusters de forte et de faible résistance.

1. Matériel et méthodes

1.1 Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée dans le département du Plateau en République du Bénin dans trente deux villages des communes de Sakété, d'Ifangni, de Pobè et de Kétou. Ces villages sont identifiés suivant le niveau de résistance des vecteurs comme l'indique le chapitre VI.

Compte tenue de l'absence de larves dans six clusters (Ko-Aidjedo, Kétougbékon, Okéola, Zoungougo, Akadja et Ikéman), il y a eu 13 villages de faible résistance et 13 de forte résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes. Les clusters sont répartis de façon inéquitable dans les quatre communes.

1.2 Type d'étude

Il s'agit d'une étude analytique, descriptive et comparative de suivi actif d'une cohorte d'enfants âgés de 06 à 48 mois, qui s'est déroulée sur douze mois. Elle a consisté à suivre activement, dans chacun des clusters, une cohorte de 30 enfants de moins de 5 ans (cohorte de détection de l'infection).

1.3 Population d'étude

La population d'étude est constituée de cibles primaires et de cibles secondaires dans les clusters (villages) répartis en zones de forte et de faible résistances des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes.

1.3.1 Cibles primaires

Elles sont constituées des enfants âgés de 06 à 59 mois (le jour de leur inclusion dans l'étude) répondant aux critères d'inclusion et résidant dans l'un des trente deux villages des 4 communes durant la période d'étude.

1.3.2 Cibles secondaires

Elles sont constituées des mères ou gardiennes/gardiens d'enfants constituant les cibles primaires de l'étude.

1.4 Matériel

Il est constitué de :

- fiche de consentement éclairé
- registre de recensement des enfants de 06 à 48 mois par village ;
- fiche individuelle de collecte de données sur les cibles primaires ;
- notification des résultats de laboratoire relatifs à la goutte épaisse et à la densité parasitaire des enfants inclus dans la cohorte ;
- guide de collecte de données pour les relais communautaires ;
- fiche de supervision des relais communautaires ;

- rapports mensuels d'activités des relais communautaires chargés de la collecte des données sur les enfants.

1.4 Méthode et technique d'échantillonnage

1.4.1 Cibles primaires

Un recensement général des enfants âgés de 6 à 48 mois s'est déroulé dans chacun des clusters (villages) identifiés. Au fur et à mesure que le recensement se déroulait, les agents recenseurs cochaient dans leurs registres, les ménages souhaitant faire participer leur enfant à l'étude ; ceci a facilité le tirage des enfants parmi ceux dont les parents sont potentiellement consentants.

Après la phase de recensement, on a procédé à un tirage aléatoire simple sans remise pour identifier les enfants à inclure dans la cohorte par cluster dans le cas où le nombre d'enfants recensés dépasserait le nombre d'enfants à inclure. Au cas où le nombre d'enfants recensés est inférieur ou égal au nombre à inclure, il n'y a pas eu de tirage. Le nombre recensé constituait donc la taille de l'échantillon.

1.4.2 Cibles secondaires

La méthode non probabiliste et la technique de choix raisonné ont été utilisées pour les cibles secondaires constituant les mères ou gardiens d'enfants de 06 à 48 mois. Ainsi, la personne la plus responsable de l'enfant ou son représentant a fourni des informations sur celui- ci.

1.4.3 Critères d'inclusion des cibles primaires

Sont inclus dans l'étude de cohorte les enfants âgés de 06 à 48 mois :

- résidant régulièrement (depuis un mois) dans les clusters identifiés dans les communes de Sakété, Ifangni, Pobè et Kétou;
- dont les parents ou répondants sont consentants à l'étude et acceptent des prélèvements sanguins pour la GE/FS au début de l'étude, une semaine plus tard et par la suite mensuellement.

1.4.4 Critères d'exclusion

Seront exclus de l'étude de cohorte les enfants :

- dont les parents ou répondants ne sont plus consentants à un moment donné de l'étude pour une raison ou une autre ;

- dont les parents/répondants et ou eux-mêmes sont absents pour plus d'un mois en dehors du site d'étude ;
- qui sont hospitalisés pour raison de santé plus d'un mois ;
- perdus de vue ou décédés pendant la période d'observation.

1.5 Taille de l'échantillon

La présente étude est randomisée par cluster avec deux bras : un bras dénommé « zone de faible résistance » et l'autre dit « zone de forte résistance ». Dans chaque bras, 16 villages ou clusters ont été randomisés. Et dans chaque cluster, 30 enfants de moins de 5 ans ont été suivis dans la cohorte selon les critères d'inclusions. Ainsi, dans chaque zone, l'étude a enrôlé 480 enfants de moins de 5 ans, donc une cohorte de 960 enfants de moins de 5 ans qui ont été suivis pendant 9 mois après les travaux préliminaires.

Le nombre de cibles secondaires soit de gardiens ou gardiennes d'enfants est inférieur ou égal au nombre d'enfants à inclure dans l'étude, en supposant qu'un ou plusieurs enfants répondant aux critères d'inclusion peuvent être tirés au sort dans le même ménage.

1.6 Techniques et outils de collecte des données

1.6.1 Techniques

La collecte de données sur les enfants s'est faite en deux temps : (i) dans les ménages et au point de regroupement pour les prélèvements sanguins pour le suivi actif en vue de la détection de l'infection palustre et (ii) au niveau des centres de santé pour la détection passive des cas de paludisme.

Avant la phase de constitution de la cohorte d'enfants, une phase de recensement de tous les enfants du village s'est organisée. A cet effet, un binôme de relais communautaires est identifié pour l'opération au niveau de chaque cluster. Pour ce faire, un entretien individuel est mené avec les répondants des enfants pouvant constituer la cohorte. Une fois la cohorte constituée, les deux (02) relais communautaires ont parcouru le village. Ainsi, chaque relais visite et suit la moitié de la taille de l'échantillon d'un village. Des visites mensuelles, au profit de la cohorte de détection de l'infection, sont effectuées dans les ménages par les relais communautaires du 10 au 15 de chaque mois sous la supervision directe des infirmiers points focaux et parfois des superviseurs nationaux. Les relais doivent nécessairement ignorer le statut parasitologique des enfants inclus. Les fiches sont transmises aussitôt à la formation sanitaire de tutelle au plus tard les 07 et 22 de chaque mois. Des prélèvements de sang capillaire pour la confection de GE/FS chez les enfants de la cohorte par village sont effectués

chaque fin du mois, précisément du 25 au 27 de chaque mois, par les techniciens de laboratoire pour la réalisation des gouttes épaisses. Les techniciens de laboratoire ayant en charge les prélèvements et analyses sanguins sont formés par l'équipe nationale. Les prélèvements ainsi réalisés sont acheminés au laboratoire pour l'examen. Les frottis sanguins sont fixés au méthanol et les GE sont séchées et déshémoglobinisées. Les lames sont rangées dans des portoirs à lames. Au niveau du laboratoire de la commune, les GE/FS sont colorés à l'aide d'une solution de Giemsa diluée au dixième et on a procédé à la lecture dans les 24 à 48 heures de temps. Un contrôle de qualité des lames s'est réalisé sur 10% des lames par l'équipe de l'Unité de Recherche en Parasitologie-Mycologie de la FSS/UAC. Tout enfant dont la GE est positive est traité conformément aux directives de prise en charge dans sa formation sanitaire de tutelle. Les résultats sont transmis aux infirmiers points focaux entre le 28 et le 30, voire le 31 de chaque mois. Les enfants qui sont testés positifs à la goutte épaisse sont traités par du Coartem® entre la période de 29 au 30/31 de chaque de mois.

Après les premiers prélèvements qui ont eu lieu vers la fin du mois de décembre 2012, et qui ont constitué le point de départ du suivi, tous les enfants retrouvés positifs ont été traités à l'aide des CTA en janvier 2013 et les prélèvements du suivi actif en communauté proprement dits ont démarré en février 2013. Tout enfant testé positif au cours d'un mois est traité avec du CTA conformément aux directives nationales de prise en charge puis retourné dans la cohorte. Tous les enfants participant à l'étude ont eu droit à un carnet de soins spécifique à la recherche et les parents sont sensibilisés à les envoyer dans le centre de santé publique le plus proche pour être pris en charge gratuitement avec l'appui du relais communautaire. Tous les soins administrés sont consignés dans ce dernier qui constitue l'outil de collecte de données en plus de la fiche de cluster positionnée au niveau de chaque centre de santé. Tous les soins sont administrés gratuitement aux enfants et les différents coûts sont pris en charge par l'équipe de recherche.

Neuf prélèvements ont été effectués sur une base mensuelle de Février à Octobre 2013. Les épisodes de paludisme survenus chez les enfants de la cohorte sont collectés mensuellement dans les centres de santé. En effet, pour certains clusters, la goutte épaisse réalisée sur les 30 enfants ne donne aucun résultat positif car les enfants tombent parfois malades entre deux prélèvements et sont traités avec le Coartem® en cas de TDR ou de GE positifs dans les formations sanitaires des localités. Tout enfant ayant eu un épisode de paludisme et traité au niveau du Centre de Santé avant la période de prélèvement est considéré comme positif pour le mois. Les données des 30 enfants suivis activement dans chaque cluster sont traitées et

intégrées aux données de suivi par les relais, aux résultats des prélèvements de laboratoire et aux fiches de suivi au niveau des formations sanitaires.

1.6.2 Outils de collecte des données

Les outils de collecte à utiliser sont en fonction de la technique de collecte de données et du niveau de recueil de données. Il s'agit de :

- ✓ *Recueil de données dans les ménages*
 - ⊕ Fiche de consentement éclairé
 - ⊕ Registre de recensement des enfants par village
 - ⊕ Outil individuel de collecte de données de l'enfant à remplir par le Relais Communautaire
 - ⊕ Fiche combinée individuelle de collecte de données épidémiо-socio-économique

Grille de contrôle de qualité des données collectées par les relais communautaires

- ✓ *Recueil de données parasitologiques*
 - ⊕ Registre de diagnostic parasitologique
 - ⊕ Outil individuel de collecte de données de l'enfant à remplir par le laboratoire
 - ⊕ Grille de contrôle de qualité des lames de GE

1.7 Variables mesurées

1.7.1 La variable dépendante

Il s'agit de l'infestation palustre chez les enfants âgés de 06 à 48 mois de la cohorte.

L'infestation palustre prend en compte la goutte épaisse positive (GE+).

1.7.2 Les variables indépendantes

Ces variables sont catégorisées en cinq. Il s'agit de :

- ✓ *Variables démographiques*
 - Age des répondants
 - Sexe des répondants
 - Age de l'enfant
 - Sexe de l'enfant
- ✓ *Variables environnementales et culturelles*
 - Type d'habitat;

- Habitats groupés;
- Zone marécageuse ou abritant un bassin ou cours d'eau;
- Absence de gîtes larvaires;
- Religion;
- Groupe sociolinguistique;

✓ *Variables liées aux comportements des parents*

- Administration de médicaments antipaludiques à l'enfant à titre préventif;
- Administration de remèdes traditionnels à l'enfant;
- Fréquence d'administration de remèdes traditionnels à l'enfant;
- Type de recours aux soins;
- Utilisation de la MIILD par tous les membres de la famille
- Utilisation d'autres moyens de prévention du paludisme

✓ *Variables sanitaires liées à l'enfant*

- Disponibilité de MIILD pour l'enfant de la cohorte
- Fréquence d'utilisation de la MIILD par l'enfant de la cohorte
- Etat de MIILD utilisée par l'enfant de la cohorte (sans ou avec trous)
- Type de moustiquaire utilisée par l'enfant
- Episode de fièvre dans la quinzaine précédent la visite de l'enfant
- Antécédent de maladie dans la quinzaine précédent la visite de l'enfant
- Prise de médicaments antipaludique suite à un épisode de paludisme
- Prise de médicaments suite à une maladie autre que le paludisme dans la quinzaine précédent la visite de l'enfant.

1.8 Aspects opérationnels des variables

La variable dépendante « infestation palustre » chez les enfants âgés de 06 à 48 mois inclus dans la cohorte a deux modalités : oui ou non. Ainsi, la variable dépendante est dichotomisée. Quant aux autres variables indépendantes, les modalités varient de 2 à plusieurs selon la variable. Il s'agit des variables pouvant expliquer l'infestation palustre.

L'infestation palustre est appréciée par rapport à chaque enfant de la cohorte et par rapport à chaque groupe de villages selon la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes. Il n'y a pas de variable composite dans l'ensemble des variables indépendantes. Il n'y a pas donc de variables à opérationnaliser.

La figure 23 présente les enfants suivis pendant 9 mois dans 26 clusters et les observations réellement réalisées.

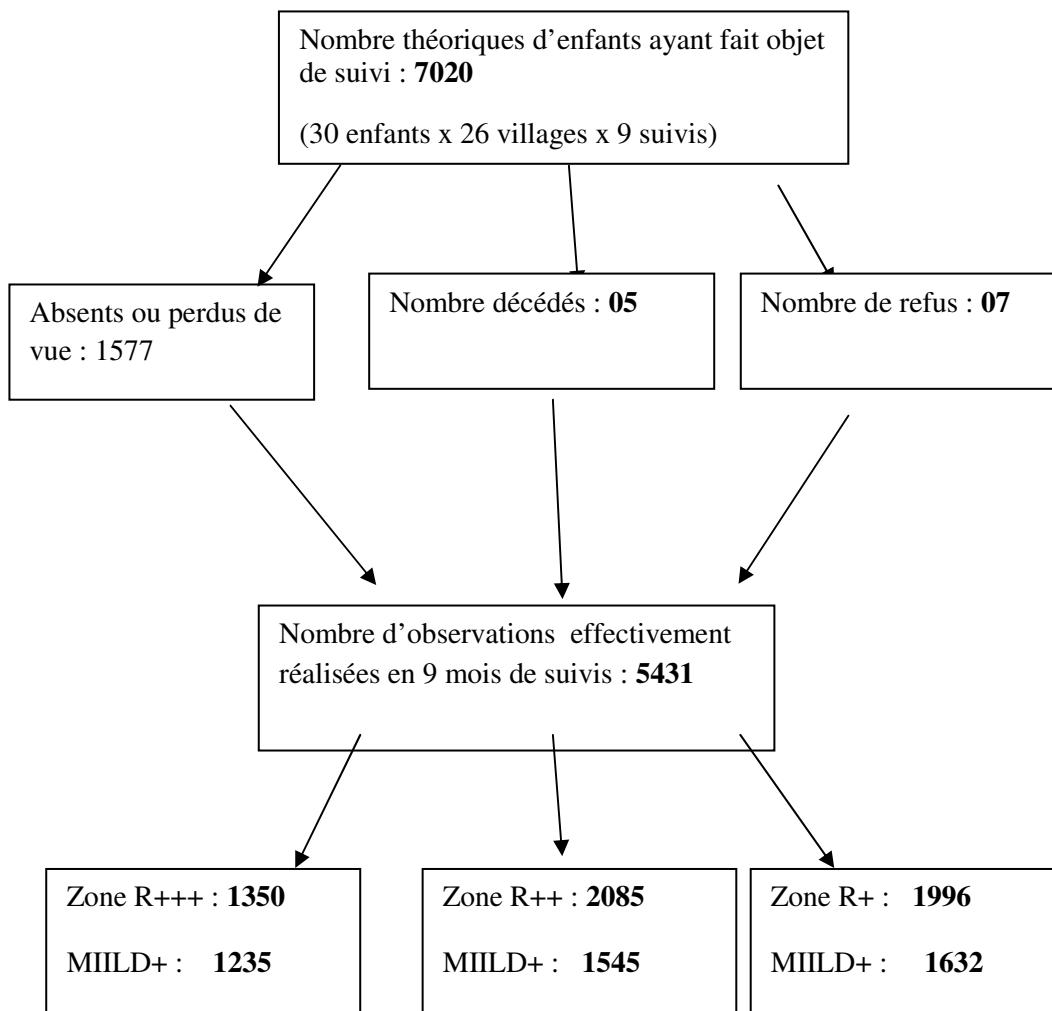


Figure 23 : Les observations réalisées au cours du suivi des enfants de la cohorte

1.9 Sensibilité des anophèles à la deltaméthrine

Dans chacune des 32 clusters, des prospections de larves d'anophèles ont été réalisées en octobre-novembre 2012, en juin 2013 et en octobre 2013. Les larves ont été élevées au laboratoire. Les adultes obtenus sont identifiées morphologiquement grâce aux clés de Gilles & de Meillon (1968) et seules les femelles *An. gambiae* sont utilisées pour les tests de sensibilité au laboratoire. Ce test a été réalisé comme décrit dans le chapitre II.

Le taux de mortalité est calculé et interprété selon les critères recommandés par l'OMS (OMS, 2013).

- Mortalité > 98% : population dite sensible
- Mortalité comprise entre 90-97% : résistance suspectée
- Mortalité < 90% : population résistante

En absence de zone de franche sensibilité, nous avons défini R+ (mortalité > 98%) comme zone de faible résistance, R++ (mortalité entre 90-97%) comme zone de résistance suspectée et R+++ (mortalité < 90%) comme zone de forte résistance.

1.10 Analyse des données

Les données collectées ont été doublement saisies sur une base de données informatisée accessible à des personnes autorisées disposant d'un code d'accès à la base. Chaque enfant est identifié par un code d'identification unique qui a servi à la saisie des données dans la base. Ainsi, aucune information relative à l'identité de l'enfant ne figure dans la base de données. Si un parent décidait de retirer à un moment donné de l'étude son enfant, après avoir donné son consentement éclairé initial, ses données ne sont pas utilisées pour l'étude. Les données collectées sont saisies dans un masque conçu à l'aide de Epi data (Database and statistics software for public health professionals, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA) de Epi info version 3.5.1. Les analyses ont été faites à l'aide de SPSS 16.0. et de Epi info version 3.5.1. Les données parasitologiques ont été analysées séparément en termes de prévalence de *P. falciparum* des formes sanguines asexuées de même que la densité de *P. falciparum* des formes sanguines asexuées dans les gouttes épaisses de parasites positives.

Les différents résultats de l'étude sont présentés par objectif après une description sommaire des caractéristiques des échantillons.

Les caractéristiques des enfants de la cohorte (suivi actif) sont données sous la forme de tableaux récapitulatifs. La répartition des enfants infestés par le *Plasmodium* s'est faite par regroupement de clusters suivant le statut des vecteurs décrit plus haut.

L'aspect descriptif des variables est abordé tant pour la variable dépendante que pour les variables indépendantes sous diverses formes. Une analyse descriptive uni-variée est effectuée pour décrire les caractéristiques socio-anthropologiques et démographiques des enfants. Les tests statistiques de Khi carré (χ^2) de Pearson et de test exact de Fischer ont été utilisés pour déterminer et comparer la relation entre deux variables aléatoires au seuil de signification de 0,05.

Les tendances d'évolution des incidences par rapport aux taux de mortalité à la deltaméthrine ont été observées. Les coefficients de corrélations ont été déterminés pour apprécier les liens existant entre les incidences et les niveaux de sensibilité à la deltaméthrine. Les données parasitologiques ont été analysées séparément en termes de prévalence et de densités parasitaires de la forme sanguine asexuée de *P. falciparum*.

L'efficacité protectrice des MIILD a été calculée à partir de l'OR par la formule EP = 1-OR (Olivier *et al.*, 2004). Des analyses multi variées à l'aide de la régression logistique ont permis d'identifier des facteurs associés l'infestation palustre.

2. Résultats

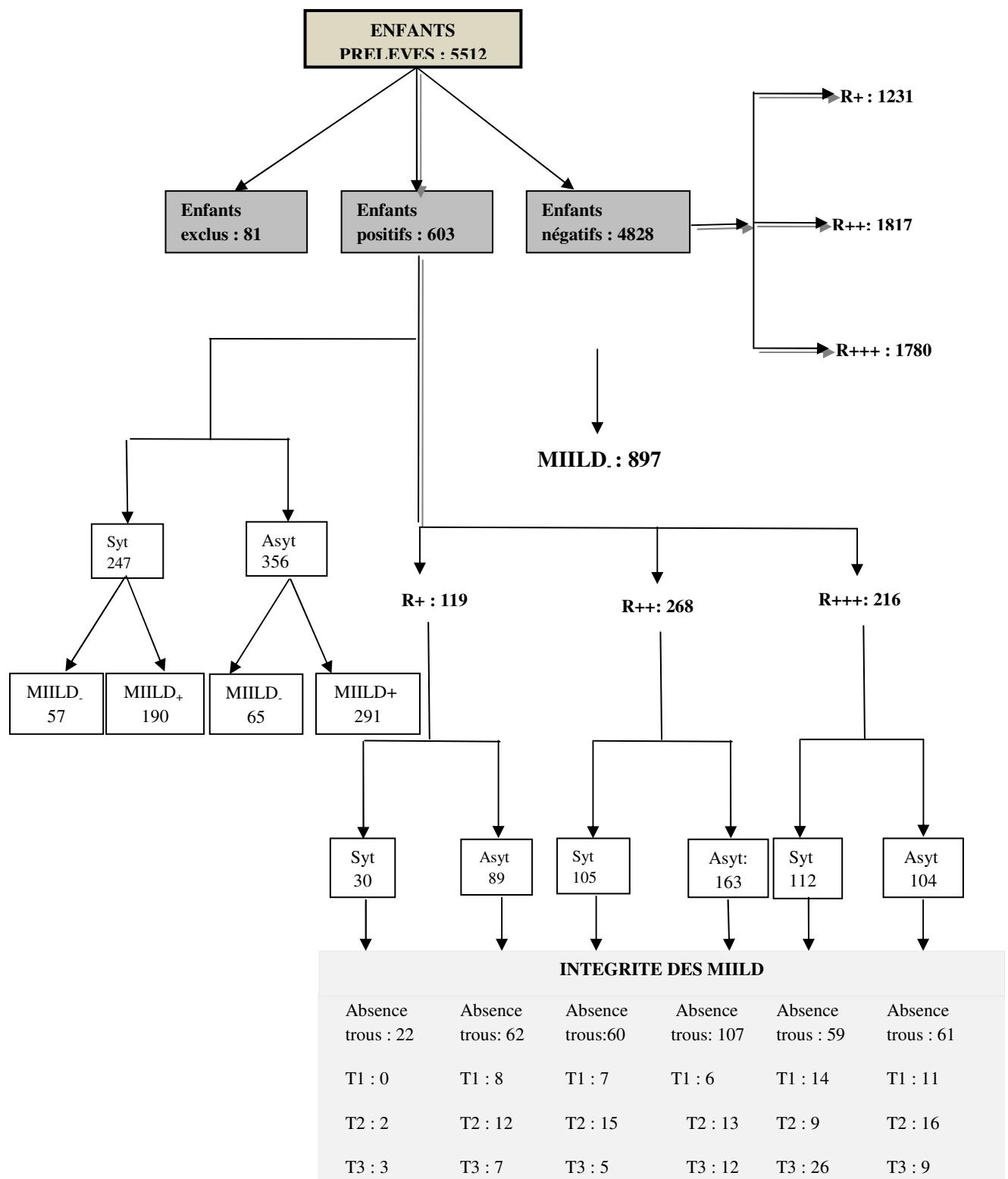
2.1 Tests de sensibilité des anophèles à la deltaméthrine

Les 32 villages ont été prospectés pendant les trois passages (octobre-novembre 2012 ; juin-juillet 2013 et octobre 2013). Parmi ces villages, certains n'ont pas présenté de gîtes productifs à *An. gambiae* lors de nos prospections. Ainsi, nous disposons de données de sensibilité à la deltaméthrine pour 26 clusters en novembre 2012 ; 26 en juin 2013 et 27 en octobre 2013. Les taux de mortalité ont varié de 76 à 100 % (médiane à 95%) pour les résultats des tests réalisés en novembre 2012. En juin 2013, les taux de mortalité ont varié de 60,8 à 100 % (médiane à 95,3%) dans les clusters retrouvés positifs lors des prospections larvaires. En octobre 2013, les résultats des tests de sensibilité ont varié de 84,9 à 100% (médiane à 93,7%). Il est à noter ainsi que des mortalités à la deltaméthrine ont augmenté dans certains villages (c'est-à-dire sensibilité accrue). D'un passage à l'autre, les populations d'*An. gambiae* ont changé de sensibilité. Le maintien du même technicien, la constance de la température et de l'humidité relative ainsi que les taux nuls de mortalité au niveau des témoins excluraient des problèmes techniques liés aux manipulations qui soient survenus lors de nos tests. Les coefficients de corrélation entre les taux de mortalité réalisés à partir du test de Spearman indiquent qu'il existe une corrélation moyenne entre juin-juillet 2013 et octobre 2013 ($r = 0,42$; $p = 0,06$). Entre octobre-novembre 2012 et juin-juillet 2013 ($r = -0,78$; $p = 0,74$), il n'existe pas de lien. Pour les taux de mortalité de octobre-novembre 2012 et octobre 2013 ($r = -0,55$; $p = 0,009$), il y a une corrélation moyenne entre ces données.

2.2 Description de la population des enfants de moins de 5 ans

Pendant neuf mois, 780 enfants de 26 villages (180 dans les 6 villages de faible résistance « R+ », 300 dans les villages où la résistance est suspectée « R++ » et 300 dans les villages de forte résistance « R+++ ») ont été suivis sur le plan parasito-clinique compte tenu de l'absence de larves dans six clusters. Les enfants nés au cours de l'étude n'ont pas été inclus. L'âge moyen est comparable (22 mois) dans l'ensemble des villages. Pour la zone R+, il est de 21 mois, 24 mois pour la zone R++, et enfin 21 mois pour la zone de forte résistance. Le sexe ratio M/F était équilibré: 1,0 ; 1,0 ; 1,1 respectivement pour R+, R++ et R+++. Pour l'ensemble des villages il est de 1,1. La participation des enfants au suivi clinique était élevée dans les trois groupes (figure 23).

Un total de 22% des enfants était absent ou perdu de vue au cours des suivis et moins de 1% était décédé (5 enfants morts sur les 9 mois de suivi). Un total de 5512 gouttes épaisse a été réalisé avec une moyenne d'environ 8 par enfant. La répartition des échantillons de sang prélevés est représentée sur la figure 24.



Syt : symptomatique Asyt : asymptomatique

Figure 24 : Répartition des prélèvements en fonction des zones, de l'état clinique des enfants et des observations réalisées sur les MIILD

2.3 Incidences, taux d'infestation et densités parasitaires selon les niveaux de résistance des vecteurs

Au cours du suivi, nous avons observé que la moitié des enfants n'ont pas été infestés (49,23%). En lien avec l'utilisation des MIILD, 54% des enfants suivis n'ont pas été infestés et le nombre moyen de fois qu'un enfant s'infeste est de 0,75.

2.3.1 Evaluation de l'incidence cumulée du paludisme maladie suivant les niveaux de résistance des vecteurs aux insecticides

En prenant un épisode palustre comme la présence de fièvre ou d'antécédent de fièvre dans les 48 heures avec une parasitemie positive, 247 enfants malades du paludisme sur les 603 ont été retrouvés positifs après le suivi. Environ 77% de ces enfants impaludés ont utilisé de MIILD toutes les nuits. Nous avons observé que plus de 74% de ces enfants ont utilisé des MIILD en bon état (141/190). En considérant les trois groupes de localités de résistance, 25% des enfants positifs ont fait le paludisme en R⁺. En R⁺⁺ et R⁺⁺⁺, respectivement 39% et 51% des enfants positifs ont fait le paludisme (Figure 24). L'incidence cumulée du paludisme maladie est de 35,2 pour 1000 enfants suivis pendant 9 mois (Tableau XXIII). Elle est de 18,5; 38,9 et 41,5 pour 1000 enfants suivis pendant 9 mois respectivement dans les clusters R⁺, R⁺⁺ et R⁺⁺⁺. Les rapports des taux déterminés à partir de ces données indiquent clairement que dans la zone où les vecteurs sont de faible résistance, l'incidence est faible ($p=0,000$). La figure 25 présente l'évolution des incidences du paludisme maladie en fonction du temps dans les différentes localités.

Tableau XXIII : Evaluation des incidences du paludisme maladie suivant les différentes zones de résistance des vecteurs aux insecticides

Zones de résistance	Enfants asymptomatiques	Enfants symptomatiques	Total population	Incidence cumulée maladie	Rate Ratio
R ⁺	89	30	1620	18,52(13,0-26,3)	-
R ⁺⁺	163	105	2700	38,89(32,2-46,9)	2,1(1,41-3,14) p=0,0003
R ⁺⁺⁺	104	112	2700	41,48(34,6-49,7)	2,24(1,50-3,34) p=0,00007
Total général	356	247	7020	35,19(31,1-39,8)	

Lorsqu'on considère les localités R⁺ et R⁺⁺, on note une corrélation moyenne suivant le test de Pearson (R+R⁺⁺ r= 0,407 ; p= 0,277). En revanche, les localités R⁺ et R⁺⁺⁺ ont montré

une faible corrélation sans grande différence ($R+$ et R^{++} $r= 0,133$; $p= 0,73$). En comparant les localités R^{++} et R^{+++} on observe une corrélation forte ($r= 0,66$; $p= 0,05$). Les mêmes tendances et corrélations ont été observées avec les incidences moyennes des infestations palustres et les taux de mortalité à la deltaméthrine.

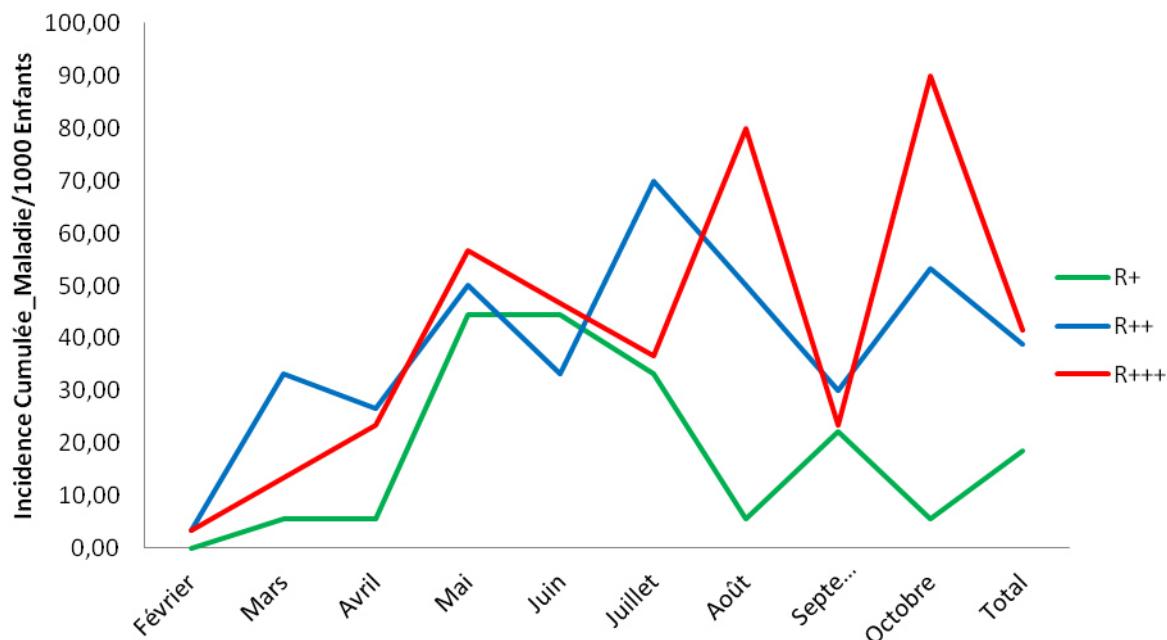


Figure 25: Evaluation des incidences cumulées du paludisme maladie dans les trois types de localités

Nous avons observé également que l'état clinique des enfants dans les différentes localités a été fortement associé à l'infestation. Le tableau XXIV présente le lien entre la présence de fièvre et l'infestation palustre. Cette même observation a été faite suivant les différents mois de suivi. Toutefois, dans les zones R^{++} et R^{+++} , on note plus d'enfants malades que dans les zones R^+ .

Tableau XXIV : Etats cliniques des enfants et infestation en fonction des niveaux de résistance

Zones de Resistance	Etats des enfants	Positifs	Négatifs	Odds Ratio
R+	Symptomatiques	30	121	1
	Asymptomatiques	89	1110	3,09(1,9-4,8) p<0,001
Total R+		119	1231	
R++	Symptomatiques	105	168	1
	Asymptomatiques	163	1649	6,32(4,7-8,5) p<0,0001
Total R++		268	1817	
R+++	Symptomatiques	112	206	1
	Asymptomatiques	104	1574	8,23(6,1-1,2) p<0,0001
Total R+++		216	1780	
Total général		603	4828	

2.3.2 Evaluation de l'incidence d'infestation suivant les niveaux de résistance des vecteurs aux insecticides

L'incidence d'infestation palustre a été de 85,9 pour 1000 enfants suivis (603/7020) pour l'ensemble des villages. Ce taux a été de : 73,5 ; 99,0 et 80,0 pour 1000 enfants suivis respectivement dans les villages R+, R++ et R+++. Lorsqu'on considère les zones R+ et R++, on observe un écart entre les incidences d'infestation. Le rapport des taux réalisé donne RR : 1,35(1,2-1,7) p=0,008. Entre R+ et R+++, l'écart observé n'est pas significatif RR : 1,1 (0,9-1,4) p=0,47.

En vue d'évaluer l'influence de la résistance sur ces taux d'infestation, nous avons proposé des modèles pouvant mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre ces deux informations. Il s'agit dans un premier temps de faire varier les taux moyens d'incidence de chaque cluster sur les 9 mois de suivi par rapport à chaque passage de prospection larvaire. Aucune corrélation n'a été obtenue. La figure 26 présente l'évolution de ces deux paramètres par rapport à la période de suivi.

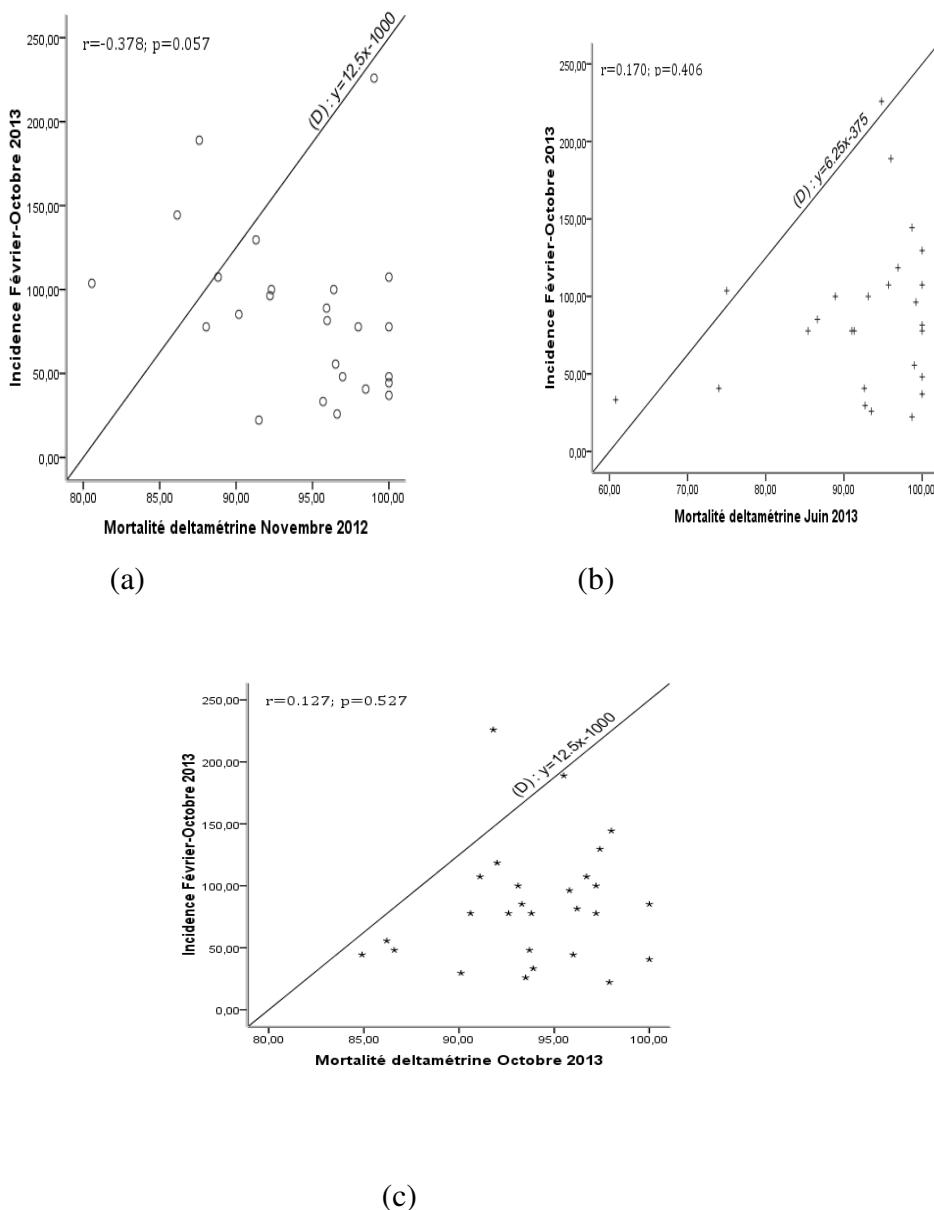


Figure 26 : Evaluation des incidences d'infestation au niveau de chaque cluster en fonction des trois taux de mortalité à la deltaméthrine

Lorsque nous avons rapproché les périodes de prospection larvaire en vue de la détection du niveau de mortalité des anophèles à la deltaméthrine avec les données d'incidences de la même période, nous avons observé que les coefficients de corrélation sont améliorés mais ne présentent toujours aucune tendance significative. La figure 27 (a) présente les données d'incidence sur la période de mars-août 2013, sur le taux de mortalité de juin 2013 et la figure 27 (b) présente les incidences par cluster de septembre-octobre 2013 sur les taux de

mortalité d'octobre 2013. Ainsi donc, pour la répartition des villages, nous avons utilisé les taux de mortalité de la période de forte transmission.

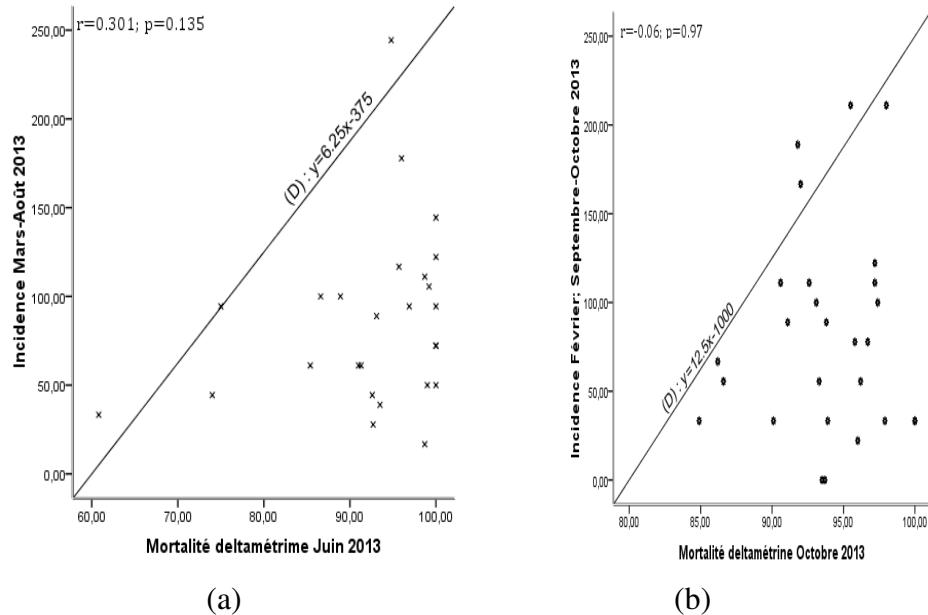


Figure 27: Evolution des incidences d'infestation au niveau de chaque cluster en fonction des taux de mortalité à la deltaméthrine rapprochés de la période de prospection larvaire.

2.3.3 Evaluation des taux d'infestation des enfants dans les différents types de localités

Les moyennes des taux d'infestations sont comparables dans les différentes localités. Ces taux moyens ont été respectivement de 8,83 ; 12,87 et 10,84% pour les enfants provenant des clusters R+; R++ et R+++. L'analyse de variance à partir du test Anova n'a montré aucune différence entre ces proportions ($p=0,107$). La figure 28 présente les évolutions des taux des infestations entre les trois types de zone. Lorsqu'on considère R+ et R++, on note une forte corrélation suivant le test de Pearson ($R+R++ r= 0,695 ; p= 0,03$). Les zones R+ et R+++ ont aussi montré une corrélation avec une différence limite ($R+R+++ r= 0,65 ; p= 0,05$).

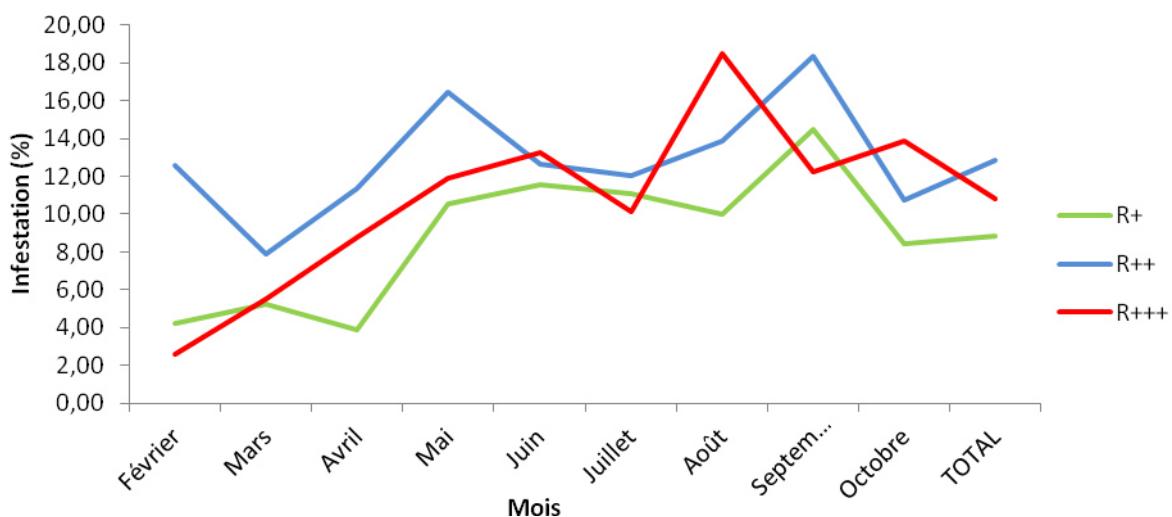


Figure 28: Evaluation des taux d'infestation palustres dans les trois types de localités

2.3.4 Evaluation des densités parasitaires dans les différentes localités de résistance des vecteurs

Avec les données de base de novembre-décembre 2012, on n'a pas observé de différence de nombre moyen géométrique des densités parasitaires ($p=0,29$). Les moyennes géométriques des densités parasitaires présentées dans le tableau XXV ont varié lors du suivi réalisé ($p=0,0058$). Dans les zones de faible résistance, la moyenne géométrique des densités parasitaires chez les malades du paludisme a été supérieure à celle des enfants porteurs de parasites ($p=0,000$) alors que dans les zones de résistance suspectée ou de forte résistance, cette moyenne géométrique des densités parasitaires a été supérieure chez les enfants non malades que chez les enfants souffrant du paludisme ($p<0,0001$).

Tableau XXV : Evaluation des densités parasitaires des enfants en fonction des niveaux de résistance des localités de provenance

Variables	Localités		
	Zone R+	Zone R++	Zone R+++
Moyennes géométriques des DP de Novembre 2012 (IC95%)	7344 [4248-1270]	3689 [2635-5167]	3217 [2116-4892] p=0,2900
Moyennes géométriques des DP après les 10 mois de suivi 2013(IC95%)	1617 [1465-1465]	2273 [2046-2526]	2157 [1942-2396] p=0,0058
MGDP asymptomatiques (IC95%)	1459 [1330-1601]	1694 [1546-1855]	1509 [1387-1642]
MGDP symptomatiques (IC95%)	3650 [2288-5822] p=0,0004	1600 [999-2562] p<0.0001	1421 [9222-2189] p<0.0001

MG : Moyenne Géométrique ; DP : Densités Parasitaires ; IC Intervalle de Confiance

2.4 Efficacité protectrice des MIILD et influence de la résistance

Les résultats des analyses bi-variées réalisées à partir des variables « utilisation des MIILD toutes les nuits et la nuit précédent le suivi » et l'infestation parasitaire dans les différents types de localités sont présentés dans le tableau XXVI. L'efficacité protectrice n'a pas été perceptible dans l'ensemble des zones et dans les localités où la résistance est installée. L'efficacité protectrice a été de 55% dans les localités de faible résistance des vecteurs aux insecticides. L'influence de la résistance est bien observée dans les localités de suspicion de la résistance que dans les zones de forte résistance. Les enfants provenant de ces types de localités ont plus de 31% de chance de faire une parasitémie positive que ceux qui sont dans les localités de faible résistance. Pour les enfants positifs dans l'ensemble des clusters, 19,76% ont déclaré avoir utilisé de MIILD contre 72,38% pour ceux qui ont été négatifs (tableau XXVI).

Tableau XXVI : Influence de la résistance sur l'efficacité protectrice des MIILD dans les différentes localités

Zones de résistance	MIILD	Positif	Négatif	Total	% Infestation	Odds Ratio	Odds Ratio R+vs R++ et R+ vs R+++
Zone R+	Non	5	110	115	4,35	1	
	Oui	114	1121	1235	9,23	0,45(0,2-1,1) p>0,05	1
Total R+		119	1231	1350	8,81		
Zone R++	Non	72	468	540	13,33	1	
	Oui	196	1349	1545	12,69	1,06(0,8-1,4) p>0,05	0,69(0,6-0,9) p<0,05
Total R++		268	1817	2085	12,85		
Zone R+++	Non	45	319	364	12,36	1	
	Oui	171	1461	1632	10,48	1,21(0,85;1,71) p>0,05	0,868(0,677;1,12) p>0,05
Total R+++		216	1780	1996	10,82		
Pour l'ensemble		122	897	1019	11,97	1	
		481	3931	4412	10,90	1,11(0,89;1,373) p>0,05	
Total général		603	4828	5431	11,10		

En analysant les résultats par cluster, il existe des localités où tous les enfants positifs ont dormi sous MIILD dans la période de nos travaux. En zone R+, 3 clusters sont concernés sur les 6. Il s'agit de Ko-koumolou, Kpankpoun et Okpometa. Deux clusters sont concernés dans les zones R++ (Alabansa et Djegou-Djedji) et pour les zones R++, 3 clusters ont présenté des villages où tous les enfants positifs ont utilisé de MIILD toutes les nuits (Agbarou ; Djohouncollé et Ko-dogba).

Un cluster a présenté une caractéristique particulière de n'avoir aucun enfant positif qui ait utilisé de MIILD. Pour le reste des localités de R++ (7 clusters) et R+++ (6 clusters), l'efficacité protectrice n'était pas statistiquement prouvée. Nous avons observé que tous les villages de faible résistance (R+) ont montré de forte protection par les MIILD (Tableau XXVII). Les clusters exempts de résistance ont fait observer de nette protection.

Tableau XXVII : Analyse des résultats d'efficacité protectrice des MIILD dans les clusters suivant les particularités observées dans les différentes zones de résistance

Zones Résistance Cluster	MIILD	Positifs	Négatifs	Total	% Infestation	Odds Ratio
Lokossa						
	Non	3	20	23	13,04	1
	Oui	6	183	189	3,17	1,55(0,05-0,53) p<0,05
	Total Lokossa	9	203	212	4,25	
Mowodani						
	Non	1	13	14	7,14	1
Zone R+	Oui	27	217	244	11,07	0,086(0,011,-,67) p<0,05
	Total Mowodani	28	230	258	10,85	
Zihan						
	Non	1	24	25	4,00	1
	Oui	26	163	189	13,76	0,048(0,007- 0,36) p<0,0001
	Total Zihan	27	187	214	12,62	
Araromi						
Zone R++	Non	29	119	148	19,59	1
	Oui	0	6	6	0,00	-
	Total Araromi	29	125	154	18,83	

2.5 Facteurs associés à la survenue des infestations

Les résultats de l'analyse multi-variée des différentes variables ont permis de recenser un certain nombre qui sont associées à la survenue des infestations chez les enfants de l'étude. Le tableau XXVIII présente ces variables et les résultats issus du modèle de régression logistique appliqué. Les bas niveaux d'instruction des parents ($p=0,025$), les habitats groupés ($p=0,02$), les fièvres ou les antécédents de fièvre ($p=0,000$), l'utilisation des MIILD toutes les nuits ($p=0,000$), l'utilisation des MIILD une fois toutes les 2 ou 3 nuits ($p=0,04$), l'utilisation irrégulière des MIILD ($p=0,000$), l'utilisation d'autres moyens de prévention ($p=0,017$), les zones de résistance suspectée ($p=0,017$) et la période de forte pluie ($p=0,000$) sont des facteurs associés à la survenue des infestations (tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Analyse multivariée des facteurs associés à la survenue des infestations chez les enfants de moins de 5 ans

FACTEURS ASSOCIES	Coefficient Bêta	Odds Ratio	Significativité
NIVEAU D'INSTRUCTION DU PARENT	-	-	0,006
Aucun niveau	0,000	1	-
Universitaire	0,193	1,213[0,946-1,556]	0,128
Secondaire	-0,071	0,932[0,358-2,427]	0,885
Primaire	-0,55	0,577[0,357-0,933]	0,025
HABITAT GROUPE	-	-	-
Non	0,000	1	-
Oui	0,259	1,295[1,042-1,610]	0,02
FIEVRE	-	-	-
Non	0,000	1	-
Oui	-0,455	0,635[0,515-0,782]	0,000
FREQUENCE D'UTILISATION DE MIILD	-	-	0,000
Toutes les nuits	0,000	1	-
Une fois toutes les 2 ou 3 nuits	-0,515	0,597[0,359-0,993]	0,047
De façon irrégulière	-2,254	0,105[0,04-0,272]	0,000
Pas du tout	0,336	1,4[0,707-2,773]	0,335
AUTRES MOYENS DE PREVENTION	-	-	-
Non	0,000	1	-
Oui	-0,403	0,668[0,480-0,930]	0,017
ZONE DE RESISTANCE	-	-	0,018
R+	0,000	1	-
R++	-0,303	0,739[0,576-0,948]	0,017
R+++	0,054	1,056[0,856-1,303]	0,613
UTILISATION MIILD	-	-	-
Non	0,000	1	-
Oui	-1,967	0,14[0,057-0,345]	0,000
PERIODE DE TRANSMISSION	-	-	0,000
Février-Mars	0,000	1	-
Avril-Juillet	-0,774	0,461[0,346-0,615]	0,000
Août	-0,202	0,817[0,663-1,009]	0,06
Septembre-Octobre	0,127	1,136[0,855-1,509]	0,381

3. Discussion

La question de l'impact des moustiques résistants sur l'efficacité des MIILD dans les conditions de terrain devient une préoccupation majeure. L'extension rapide de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes a remis en question l'efficacité des MIILD comme stratégie majeure actuellement promue par les PNLP dans la prévention du paludisme.

Dans notre cohorte de suivi longitudinal de 30 enfants par cluster après la couverture universelle des MIILD obtenue en 2011, et le traitement par les CTA de ceux qui sont malades ou infestés dans des localités de différents niveaux de résistance des vecteurs aux insecticides, on observe une incidence d'infestation relativement faible, avec 0,75 épisode d'infestation par enfant et pour la période de suivi, soit environ 1 épisode d'infestation palustre par an. Ce nombre d'épisode annuel est inférieur à 1,5 trouvé dans une autre localité au sud du Bénin où les vecteurs sont résistants aux insecticides (Damien *et al.*, 2010). Cette baisse pourrait être liée à la campagne de distribution des MIILD réalisée en 2011. Chez la moitié des enfants suivis, on observe une absence d'infestation. L'incidence de la maladie a été de 35,19 pour 1000 enfants suivis dans des localités de transmission élevée. Cela dénote de l'intérêt que les populations accordent à l'utilisation des MIILD dans la zone. Surtout, tous les cas (100%) de paludisme notés sont des cas simples. L'incidence de paludisme (maladie et infestation) remarquablement basse observée dans la zone de "sensibilité" des vecteurs par rapport aux zones où les vecteurs sont résistants est une information capitale. Elle a diminué dans la zone tout au long de l'étude. L'incidence de la maladie a été de 3,5% alors que dans le département du Plateau, l'incidence du paludisme simple chez les enfants de moins de 5 ans était de 19,85% (SNIGS, 2012). Une diminution de plus de 80% qui serait liée donc à la rigueur dans la confirmation et le rapportage des cas, à l'utilisation massive des MIILD et à l'utilisation d'autres moyens de protection et surtout au traitement par les CTA a été observée. Toutefois, les données du SNIGS ne constituent que des informations de routine collectées au niveau des formations sanitaires qui ne sauraient être superposées à des résultats de suivi d'une cohorte d'enfants en communautés. De nombreux travaux en Afrique ont montré une baisse importante du nombre de décès et d'hospitalisations liés au paludisme au cours de la dernière décennie, et il est régulièrement montré que les interventions de contrôle du paludisme y compris l'utilisation de moustiquaires et les CTA sont responsables de ces baisses (Ceesay *et al.*, 2007; Otten *et al.*, 2009). Cependant, peu de ces études ont été réalisées dans des contextes de suivi longitudinal de cohorte d'enfants dans les zones d'endémicité où les vecteurs sont résistants aux insecticides. Les résultats de nos travaux ont montré une augmentation de l'incidence du paludisme en rapport avec une élévation de la résistance des

vecteurs. Ces résultats sont semblables à ceux de Trape *et al.* (2011) qui ont observé une augmentation du nombre de cas de paludisme avec une diminution du taux de mortalité à la deltaméthrine au Sénégal après la couverture universelle en MIILD. De plus, les travaux de Asidi *et al.* (2012) ont révélé une perte d'efficacité de ces moustiquaires en zone de résistance comparativement à la zone de sensibilité. Les travaux de Gnanguenon *et al.* (2013) ont montré que les moustiques résistants peuvent résister à l'effet excito-répulsif des MIILD et pénétrer les moustiquaires imprégnées pour se nourrir sur leurs hôtes lorsqu'ils retrouvent des ouvertures.

Le taux d'infestation palustre a été plus bas en zone de sensibilité des vecteurs. La faible prévalence de la parasitémie asymptomatique dans cette cohorte a été inférieure à 5 % sur la base de la microscopie mensuelle. Compte tenu de l'absence de critères standards de diagnostic clinique, la parasitémie asymptomatique décrit dans la présente étude représente si oui ou non les enfants étaient dans une période pré-symptomatique, à l'exclusion de tout enfant qui aurait développé le paludisme dans les sept jours (Laishram *et al.*, 2012). Bien que les définitions de cas peuvent varier selon les auteurs, la faible prévalence de l'infection asymptomatique observée ici suggère que les traitements rapides et répétés avec les CTA sont efficaces et peuvent modifier l'acquisition de l'immunité anti-parasite, ce qui limite les infections symptomatiques chez les jeunes enfants. D'autres études portant sur l'impact des traitements rapides sur le développement de l'immunité anti-palustre seraient nécessaires.

Dans notre étude, l'efficacité protectrice des moustiquaires utilisées par les enfants tout au long du suivi a été estimée à 55% dans les localités de faible résistance des vecteurs aux insecticides. Ce taux est supérieur aux estimations d'efficacité des moustiquaires imprégnées qui sont de l'ordre de 50% en zone d'endémie où les anophèles sont sensibles aux insecticides (Lengeler, 2004). Toutefois, malgré la résistance des vecteurs, les travaux de Henry *et al.* (2005) en Côte d'Ivoire ont montré une protection de 56% dans les localités par les moustiquaires imprégnées aux insecticides. Il faudra noter que dans notre étude, les suivis ont été réalisés dans des conditions réelles de terrain où les comportements des populations ont été observés. Dans les localités de forte résistance R+++ ou de résistance suspectée R++, cette efficacité protectrice n'est pas trop perceptible. Les clusters de faible résistance ont montré une nette protection par les MIILD alors que dans tous les villages où la résistance est installée ou suspectée, on n'observe pas de protection appréciable chez les utilisateurs de MIILD. Ces résultats pourraient corroborer avec ceux de Trape *et al.* (2011) et de Ossè *et al.* (2013) qui avaient montré une augmentation du niveau de la transmission dans des régions sous couverture universelle de MIILD en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes.

Ainsi, en présence de moustiquaires imprégnées d'insecticides, les moustiques sensibles subissent l'effet excito-répulsif de pyréthrinoïdes et ne parviennent pas à prendre leur repas sanguin. Mais en présence de moustiques résistants, ce caractère n'est pas perceptible et le moustique joue soit sur le mauvais état des MIILD pour se gorger ou sur les mouvements des hommes à l'intérieur des MIILD pour prendre son repas sanguin. L'influence de la résistance est mieux observée dans les localités de suspicion de la résistance que dans les zones de forte résistance. Les enfants provenant de ces types de localités ont 31% de chance de faire une parasitémie positive plus que ceux qui sont dans les localités de faible résistance. Aussi, les enfants qui résident dans les localités de forte résistance ont 13% de chance d'être positifs plus que ceux qui proviennent des localités sensibles. La faible efficacité observée en zone de résistance pourrait être due à la présence de vecteurs résistants. Toutefois, le dosage quantitatif des anticorps contre des protéines salivaires spécifiques d'anophèle sur les confettis prélevés expliquerait mieux les niveaux d'exposition aux piqûres de moustiques dans les différentes localités de résistance des vecteurs aux insecticides et renseignerait mieux sur la protection par les MIILD.

Des facteurs observés tels que les zones de résistance suspectée, l'utilisation des MIILD toutes les nuits, l'utilisation des MIILD une fois toutes les 2 ou 3 nuits, l'utilisation irrégulière des MIILD, l'utilisation d'autres moyens de prévention, la période de forte pluie et les fièvres ou les antécédents de fièvre sont des facteurs déterminants dans la survenue de l'infestation palustre. Ainsi, la seule variable d'utilisation des MIILD ne permet pas d'apprécier les infestations observées. Il est clair devant ces faits qu'il faut accentuer la sensibilisation à l'utilisation des moustiquaires par toutes les populations ainsi que l'utilisation des autres moyens de protection existants et applicables selon les contextes tout en agissant à limiter la résistance. L'amélioration du niveau d'instruction des populations, la surveillance du comportement des vecteurs et la gestion de la résistance telle que le recommande l'OMS (WHO 2012) et adopté par le Bénin (PNLP/MS, 2013) doivent être une priorité.

Il y a plusieurs limites à cette étude. La cohorte a été inscrite par commodité d'échantillonnage, ce qui limite la possibilité de généraliser les résultats. Aussi, l'absence de corrélation entre les taux de mortalité des vecteurs dans les clusters du début, du milieu et de la fin de l'étude et la classification des clusters sur la base des taux de mortalité obtenus dans la période de forte transmission constituent d'autres limites. Bien que dans l'analyse, nous avons tenté d'observer séparément les incidences sous plusieurs formes et que les enfants inscrits au début de l'étude sont ceux qui ont été suivis, les liens directs entre le taux de

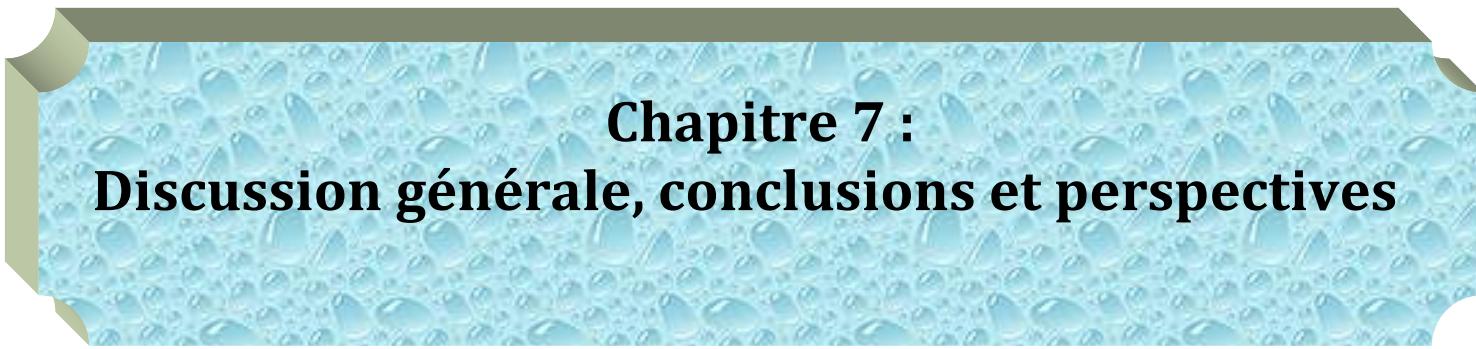
mortalité et les incidences apparaissent moins. Des informations détaillées également sur l'exposition individuelle aux piqûres de moustiques et au niveau de couverture des ménages sont disponibles. Une autre limite est l'évaluation de l'utilisation des MIILD qui est déclarative dans certains cas et non directement observer le dormeur sous moustiquaire, ce qui peut avoir surestimé le taux d'utilisation des MIILD comme l'avaient déjà indiqué les travaux de Frey *et al.* (2006).

Les enfants ont reçu un traitement gratuit contre toutes les pathologies dont le paludisme s'ils ont présenté de signes évocateurs et une confirmation parasitologique du paludisme. Ceci constitue une force à cette étude. Cependant, les moyennes géométriques des densités parasitaires dans les épisodes de paludisme ont été significativement plus élevées que celles des épisodes de parasitémie asymptomatique dans les zones de faible résistance, ce qui suggère que le paludisme a contribué à des symptômes dans la plupart des cas où un traitement antipaludique a été donné. Dans les localités où la population des vecteurs est résistante, le nombre de cas de paludisme est plus élevé et les moyennes géométriques des densités parasitaires sont plus importantes chez les cas asymptomatiques que chez les malades.

4. Conclusion

Le suivi mensuel, pendant pratiquement un an, des enfants de moins de 5 ans provenant des localités de différents statuts de vecteurs a permis d'apprécier l'évolution des indicateurs du paludisme dans la lutte antivectorielle par les MIILD. L'incidence du paludisme maladie a été l'indicateur le plus touché par la présence des populations de moustiques résistants aux insecticides.

L'incidence des infestations et le taux d'infestation à *P. falciparum* ont été relativement bas et les traitements rapides avec du CTA et l'utilisation régulière et même irrégulière des MIILD ainsi que d'autres moyens de protection contre les piqûres de moustiques ont permis d'obtenir un très faible épisode de la maladie dans l'ensemble des villages. Les localités où les vecteurs sont relativement sensibles ont montré une efficacité mais les zones où il y a des populations de moustiques résistants en forte proportion, l'efficacité protectrice ainsi que les densités parasitaires ont été influencées.



Chapitre 7 : Discussion générale, conclusions et perspectives

1. Identification des villages d'étude

Les tests de sensibilité aux insecticides ont montré que sur les 119 villages prospectés, seulement 02 des 56 villages positifs ont présenté des vecteurs totalement sensibles à la deltaméthrine. Ces résultats confirment l'expansion rapide de la résistance aux pyréthrinoïdes dans les populations naturelles d'*An. gambiae* au Bénin et globalement en Afrique (Knox *et al.*, 2014). La pratique du maraîchage sans utilisation d'insecticide dans la commune de Ifangni a permis d'y identifier la grande partie des localités où les vecteurs sont faiblement résistants. En effet, la non utilisation d'insecticide par les maraîchers est liée à la présence de nombreux bassins piscicoles à proximité des sites maraîchers. La forte pression de sélection de la résistance observée dans les autres communes serait due à l'utilisation massive des MIILD et des insecticides dans les cultures céréalières. Ces résultats confirment ceux de Nkya *et al.* (2014) et de Abuelmaali *et al.* (2013) qui ont montré que les traitements insecticides qui s'effectuent pendant la période de développement larvaire exercent une forte pression sur la sélection de la résistance.

L'objectif de cette étude est d'identifier des localités où les vecteurs sont sensibles aux insecticides et d'autres où ils en sont résistants en vue d'évaluer l'impact de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des MIILD. En absence de plusieurs localités où les vecteurs sont sensibles, nous avons procédé à une classification des villages en 2 zones, l'une de forte résistance R+++ puis, l'autre de faible résistance R+. Il faut reconnaître que ce type de classification présente des limites car les villages situés autour du seuil de 80% recommandé par l'OMS (soit légèrement en dessous, soit légèrement au-delà) constituent un groupe intermédiaire difficilement séparable de la zone R+ telle que définie ou de la zone R+++.

2. Evaluation de la disponibilité, de l'état physique et de l'utilisation des MIILD dans les différents villages

Cette étude a permis d'obtenir une proportion de 88,96% des ménages qui disposent au moins d'une moustiquaire imprégnée au sein des ménages dans le Plateau. Cette bonne disponibilité est due à la campagne de distribution universelle organisée dans le pays en 2011. Ce taux de couverture est plus élevé par rapport à celui obtenu après l'évaluation de la campagne de distribution de 2011 (Tokponnon *et al.*, 2013 ; Ossè *et al.*, 2013). En effet, 2 moustiquaires imprégnées d'insecticide ont été retrouvées par ménage dans le Plateau. La grande partie des MIILD retrouvées en communauté (87%) provient de la campagne de distribution comparativement aux 3% qui ont été achetées par les ménages et aux 9% qui proviennent du circuit de distribution de routine au niveau des formations sanitaires à travers les consultations

prénatales et les séances de vaccination antirougeoleuse. Dans 960 ménages visités, le nombre moyen de MIILD par ménage a été de 1,70 en zone de faible résistance (R^+) et de 1,82 en zone de forte résistance (R^{+++}). Le nombre moyen de personnes par ménage était de 4,88 personnes visitées. Ainsi, pour 5 personnes visitées au niveau des ménages, environ deux moustiquaires sont disponibles. L'objectif de cette campagne qui était d'augmenter le niveau de couverture de 56% (PNLP, 2011) à au moins 80% de couverture et d'avoir une moustiquaire pour deux personnes dans la population générale a été atteint. Un an après la campagne, nos résultats sont conformes aux mêmes exigences. Cette observation est une bonne performance et la couverture atteinte a été similaire à celle qui a été réalisée dans d'autre pays tel que le Nigeria (Ye *et al.*, 2012; Kilian *et al.*, 2013). Toutefois, il y a un inconvénient : 11% des ménages n'ont pas reçu de MIILD (PNLP, 2012). Le maintien de la couverture oblige de continuer avec la routine et d'identifier d'autres canaux pour rendre disponibles les MIILD au niveau des ménages. Le taux d'utilisation des MIILD observé la nuit précédant l'enquête a été de 78% et ne présente aucune variation significative entre les villages de l'étude, ce qui dénote de la réussite de la sensibilisation autour de l'utilisation des MIILD. Ainsi, le taux d'utilisation des MIILD est le même dans les deux groupes de localité contrairement aux travaux de Gnanguenon *et al.* (2013) selon lesquels la résistance pourrait augmenter la pression d'utilisation des MIILD. Cette observation a été déjà faite en Papoua Nouvelle Guinée par Hetzel *et al.* (2012). Les moustiquaires retrouvées en bon état ont été significativement plus élevées que celles observées en mauvais état pratique ou déchirées. Toutefois, les moustiquaires trouées ont été significativement plus élevées en zones de faible résistance par rapport aux zones de forte résistance ($p<0,02$) probablement à cause de leur forte utilisation en zone R^+ (Itassoumba, village à agressivité très élevée).

3. Impact de la résistance des vecteurs sur la transmission du paludisme en zone de couverture universelle des MIILD

La transmission du *P. falciparum* a été plus forte en zone de faible résistance (R^+) comparativement à celle de forte résistance R^{+++} . Le fort taux d'agressivité enregistré dans ces zones de faible résistance est dû à la densité élevée des vecteurs dans la localité de Itassoumba où les activités de productions piscicole et maraîchère (Sovi *et al.*, 2013_b) constituent les principales occupations des populations. Cette différence du TIE obtenue provient de la disparité des gîtes entre les localités R^+ et R^{+++} . Ces résultats confirment ceux de Souza *et al.* (2010) et de Klinkenberg *et al.* (2008) qui ont montré que les populations des localités

situées aux environs des zones maraîchères subissent une forte agression des vecteurs entraînant une forte transmission du paludisme. Après 02 ans de suivi, les indices sporozoïtiques des zones R⁺⁺⁺ et R⁺ ont été similaires ($p>0,05$). Il n'existe donc pas de lien entre la présence du gène de résistance et l'infectivité des vecteurs au *Plasmodium falciparum* (Ossè *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les résultats obtenus sur l'évaluation de la longévité des vecteurs ont révélé qu'il n'y a aucune différence significative entre le taux de parturité dans les deux zones (R⁺⁺⁺; R⁺). La résistance telle que définie dans les deux types de localité n'a pas eu d'impact sur la transmission du paludisme. En effet, une bonne évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des MIILD nécessite la disponibilité d'une zone sensible et d'une zone résistante des anophèles aux insecticides.

4. Impacts de la résistance des vecteurs sur les indicateurs épidémiologiques du paludisme mesurés au niveau des formations sanitaires

Au niveau des formations sanitaires, les résultats de l'évaluation des indicateurs épidémiologiques chez les enfants de moins de 5 ans n'ont pas permis de mettre en évidence l'impact de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des MIILD. Cette étude a révélé qu'un cas de fièvre sur trois est d'origine palustre dans les centres de santé. Cette information est capitale pour les programmes de lutte et les gestionnaires des intrants de lutte contre le paludisme qui devront travailler à faire respecter les directives et les politiques de lutte contre le paludisme qui recommandent la confirmation systématique des cas avant le traitement (PNLP 2011; WHO, 2010).

Contrairement au modèle de Rogier *et al.* (2009) qui a évalué l'utilisation des MIILD par une étude cas-témoins au niveau communautaire afin de disposer d'un nombre élevé d'enfants non fébriles, cette étude présente des difficultés d'obtenir des enfants non fébriles pour constituer le bras témoin. Ceci serait dû à la non fréquentation des enfants apparemment sains dans les formations sanitaires.

Cette étude a également montré que l'utilisation des MIILD par les enfants vus au niveau des formations sanitaires sur la base des déclarations de leurs parents ou accompagnants est similaire aussi bien chez les cas que chez les témoins dans les zones de forte et de faible résistances des vecteurs aux insecticides. Aussi, l'efficacité protectrice des moustiquaires utilisées la veille de l'enquête est similaire dans les deux types de zone aussi bien chez les cas que chez les témoins et inférieure au seuil défini par Lengeler en 2004. Il serait important de

continuer à explorer d'autres méthodologies d'évaluation pour mettre en évidence l'impact de la résistance sur l'efficacité des MIILD.

L'évaluation du niveau d'anticorps anti-salivaires chez les enfants a montré une forte hétérogénéité de la réponse IgG spécifique au sein des cas et des témoins, entre les 4 formations sanitaires, entre les différents villages de provenance des enfants, chez les utilisateurs ou non de MIILD et même entre les individus ayant leurs gouttes épaisses positives ou négatives. Plusieurs facteurs tels que les comportements individuels (Robert *et al.*, 2003a), l'utilisation des MIILD (Geissbuhler *et al.*, 2007), les déplacements des populations d'une localité à une autre, ou l'exposition plus élevée aux anophèles (Robert *et al.*, 2003b) pourraient être à l'origine de ces différentes observations. Mais certains facteurs épidémiologiques tels que la co-infection génétique et les paramètres nutritionnels ne pouvaient être exclus. Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec une grande retenue, vu le grand écart existant entre le nombre des infectés et celui des non infectés et la faiblesse de l'échantillon des infectés. Cette étude souligne ensuite la pertinence de l'utilisation de ce peptide marqueur biologique pour l'évaluation de l'individu, de l'exposition de la population aux piqûres et de l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle (Drame *et al.*, 2012). Les résultats immunologiques renforcent ainsi ceux épidémiologiques portant sur l'évaluation en milieu de soins de l'impact de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des MIILD.

5. Prévalence de *Plasmodium falciparum* et de l'anémie chez les enfants de moins de cinq ans en temps qu'indicateurs d'évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs sur l'utilisation des MIILD

La prévalence de *Plamodium falciparum* a été de 22% avec des variations au niveau des villages. Dans la zone de faible résistance, cette prévalence a été de 27,1% contre 17,3% en zone de forte résistance. L'enquête d'évaluation des indicateurs du paludisme menée dans la même région en 2010 par le PNLP (PNLP/MS, 2011) a obtenu une prévalence parasitaire de 44,4% supérieure à celle enregistrée dans cette étude. Cette baisse de la prévalence du paludisme pourrait être attribuée à l'utilisation des MIILD (de Oliveira *et al.*, 2010; Kilian *et al.*, 2013).

Par ailleurs la prévalence de l'anémie a été de 78,9% et est similaire à celle rapportée dans le département du Plateau en 2010 (PNLP/MS, 2011). La relation entre la prévalence de l'anémie et l'infection palustre est faible contrairement à d'autres travaux (Menendez *et al.*,

2000 ; Lamikanra *et al.*, 2007; Gosling & Hsiang, 2013). Cette prévalence enregistrée n'a aucune relation positive avec la résistance des vecteurs aux insecticides. Ces résultats corroborent à ceux de Achidi *et al.* (2012) qui ont montré que la prévalence de l'anémie pourrait être à la base d'un mauvais état nutritionnel des enfants.

L'absence de différence enregistrée entre les indicateurs épidémiologiques mesurés pour évaluer l'impact de la résistance des vecteurs sur l'efficacité des MIILD serait due à l'inexistence de zones où les vecteurs sont franchement sensibles.

6. Impact de la résistance sur des indicateurs épidémiologiques du paludisme mesurés à travers un suivi longitudinal d'une cohorte d'enfants de moins de 5 ans en zone de forte et de faible résistance

Au cours de ce suivi longitudinal des enfants, l'incidence d'infestation enregistrée a été faible, avec 0,75 épisodes d'infestation par enfant en 9 mois, soit 1 épisode d'infestation palustre par an. Cette valeur est inférieure à celle observée par Corbel *et al.* (2012) au sud du Bénin. La campagne universelle des MIILD réalisée en 2011 pourrait justifier cette baisse du nombre d'épisode palustre enregistré par an. De plus, une absence d'infestation a été notée chez 50% des enfants suivis et tous les cas de paludisme observés sont simples. L'incidence de la maladie a été de 3,5% dans les villages suivis contre 19,85 % enregistrée dans le département du Plateau (SNIGS/MS, 2012). On observe ainsi une réduction de plus de 80% qui serait liée aux différentes stratégies de lutte mises en œuvre (Aregawi *et al.*, 2011). Toutefois, la méthodologie utilisée pour la collecte des données dans cette étude est différente de celle du SNIGS.

Par ailleurs, les résultats de nos travaux ont montré une augmentation de l'incidence du paludisme en lien avec une élévation de la résistance des vecteurs. En effet, dans les zones de faible résistance, l'incidence de paludisme (maladie et infestation) a été faible comparativement aux zones de forte résistance. Ces résultats confirment ceux de Trape *et al.* (2011) qui ont enregistré une augmentation du nombre de cas de paludisme avec une baisse sensibilité à la deltaméthrine.

Le taux d'infestation palustre a été plus bas en zone de sensibilité des vecteurs. La parasitémie asymptomatique dans cette étude cohorte a été inférieure à 5 %. Ce taux de prévalence parasitaire est inférieur à celui obtenu précédemment dans l'enquête transversale réalisée dans les mêmes villages (22%) (Chapitre 5II). Cette même observation a été faite en Ouganda par Nsoba *et al.* (2004) chez des enfants du même âge. La faible prévalence de l'infection

asymptomatique observée ici montre que les traitements rapides et répétés avec les CTA et l'utilisation des MIILD sont efficaces et peuvent modifier l'acquisition de l'immunité anti-parasite, ce qui limite les infections symptomatiques chez les jeunes enfants. D'autres études portant sur l'impact des traitements rapides sur le développement de l'immunité anti-palustre pourraient être envisagées.

Dans les zones de faible résistance, l'efficacité protectrice des MIILD utilisées par les enfants a été de 55%. Par contre, dans les localités de forte résistance R+++ ou de résistance suspectée R++, cette efficacité protectrice n'est pas trop perceptible. Toutefois, l'influence de la résistance est bien observée dans les localités de suspicion de la résistance que dans les zones de forte résistance. Les enfants provenant de ces types de localités ont 31% de chance de faire une parasitémie positive plus que ceux qui sont dans les localités de faible résistance. Aussi, les enfants qui résident dans les localités de forte résistance ont 13% de chance d'être positifs que ceux qui proviennent des localités de faible résistance. La présence de gène de résistance chez les vecteurs leur conférerait une capacité de prendre leur repas sanguin quand les MIILD sont déchirées ou lorsque le dormeur offre le contact avec la moustiquaire. Il serait important de faire une étude sur le dosage quantitatif des anticorps contre des protéines salivaires spécifiques d'anophèle pour mieux expliquer les niveaux d'exposition aux piqûres de moustiques dans les différentes localités de résistance des vecteurs aux insecticides.

D'autres facteurs importants sont à considérer dans la survenue de l'infestation palustre chez les enfants. Il s'agit des facteurs tels que les zones de résistance suspectées, l'utilisation continue des MIILD, l'utilisation des MIILD une fois toutes les 2 ou 3 nuits, l'utilisation irrégulière des MIILD, l'utilisation d'autres moyens de prévention, la période de forte pluie et les fièvres ou les antécédents de fièvre. Il serait nécessaire de renforcer la sensibilisation à l'utilisation des MIILD par les populations ainsi que l'utilisation des autres moyens de protections existantes et applicables selon les contextes tout en agissant à maintenir les vecteurs sensibles. L'amélioration du niveau d'instruction des populations, la surveillance du comportement des vecteurs et la gestion de la résistance doivent être une priorité pour tous les acteurs impliqués dans la lutte.

En définitive, les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD) constituent un élément central et essentiel de toutes les stratégies de lutte contre le paludisme. Leur utilisation s'est sensiblement accrue au cours des dernières années, dans le cadre des efforts pour atteindre les objectifs mondiaux. L'augmentation importante de l'utilisation d'insecticide dans la lutte antivectorielle au cours de la dernière décennie a eu pour

conséquence d'accroître la résistance des vecteurs du paludisme en raison de la pression sélective exercée sur les gènes de résistance et a rendu difficile l'identification des zones dont les vecteurs sont franchement sensibles aux insecticides. Les différentes méthodologies utilisées ont permis d'avoir des résultats qui pourraient permettre de dire qu'à la longue, l'efficacité des MIILD pourrait être compromise si rien n'est fait. Nos résultats sont encore limités et il s'avère indispensable de consolider les données dans le temps pour comprendre au mieux l'évolution de certains paramètres épidémiologiques qui sont impliqués dans l'évaluation de l'impact de la résistance des vecteurs aux insecticides. Aussi, il serait important que les programmes nationaux de lutte contre le paludisme réalisent de façon systématique les tests appropriés de résistance des vecteurs aux insecticides en routine. Toutefois, nos résultats confirment une fois de plus que les MIILD confèrent une protection aux utilisateurs. Le Programme National de Lutte contre le paludisme devra poursuivre ces efforts pour maintenir les taux de couverture obtenus en vue réduire le fardeau du paludisme. Les progrès enregistrés pourraient être réduits à néant si l'évolution de la résistance des vecteurs reste en l'état. Des stratégies pour préserver l'efficacité des MIILD existent. Il n'y a pas de formule magique pour diminuer la résistance sans l'implication des communautés elles mêmes et des différents secteurs impliqués dans la lutte intégrée contre les vecteurs du paludisme pour retarder la propagation de la résistance et qui passerait nécessairement par la mise en œuvre du Plan National de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides dont le pays s'est doté.

Références bibliographiques

- Abuelmaali S.A, Elaagip H.A, Basheer A.M, Frah A.E, Ahmed A.T. F, et al. 2013. Correction: Impacts of Agricultural Practices on Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles arabiensis* in Khartoum State, Sudan. PLoS ONE. 8 (12).
- Achidi E.A, Apinjoh T.O, Anchang-Kimbi J.K, Mugri R.N, Ngwai A.N, et al. 2012. Severe and uncomplicated falciparum malaria in children from three regions and three ethnic groups in Cameroon: prospective study. Malar J. 24: 215.
- Aïkpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, et al. 2013. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from atacora department in Benin, west Africa: a threat for malaria vector control. Parasit. Vectors. 6(1):192
- Akogbétó M, Chippaux J.P, Coluzzi M. 1992. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin). Rev. Epidem. et Santé Publ. 40, 233-239.
- Akogbeto M, Yakoubou S. 1999. Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, west Africa. Bull Soc Pathol Exot. 92:123 – 130
- Akogbeto M.C, Djouaka R, Noukpo H. 2005. Use of agricultural insecticides in Benin. Bull. Société Pathol. Exot. 98(5):400–405
- Al Beier H, Kornelis S, Watts V. L. 1999. U.S. Patent No. 5,933,820. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 161-163.
- Alonso P. L, Smith T, Armstrong Schellenberg J. R. M, Masanja H, Mwankusye S, et al. 1994. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. The Lancet, 344(8931), 1175-1181.
- Amino R, Thibierge S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. 2006. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. C R Biol. 329, 858-62.
- Anderson J. C, Bernhard Haubold J.T, Williams G, Estrada-Franco R, Rene Mollinedo B, et al. 2000. Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. Mol. Biol. Evol. 17 (10): 1467-1482.
- Aregawi W M, Ali S A, Al-mafazy A, Molteni F, Katikiti S. et al., 2011. Reductions in malaria and anaemia case and death burden at hospitals following scale-up of malaria control in Zanzibar, 1999-2008. Mala. J. 10:46
- Asidi A, N'Guessan R, Akogbeto M, Curtis C, Rowland M. 2012. Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes, Benin. Emerg. Infect. Dis. 18(7):1101–6

- Atkinson J.A, Bobogare A, Vallely A, Boaz L, Kelly G, *et al.* 2009. A cluster randomized controlled cross-over bed net acceptability and preference trial in solomon islands: community participation in shaping policy for malaria elimination. *Malar. J.* 8(1):298
- Awolola T.S., Brooke B.D., Koekemoer L.L., Coetzee M. 2003, Absence of the kdr mutation in the molecular “M” form suggests different pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Tropical Medicine and International Health.* 8: 420-422.
- Awolola T.S, Oduola O.A, Strode C, Koekemoer L.L, Brooke B, et al. 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103(11):1139–45
- Baragatti M, Fournet F, Henry M. C, Assi S, Ouedraogo H, *et al.* 2009. Social and environmental malaria risk factors in urban areas of Ouagadougou, Burkina Faso. *Malar J.* 8(1), 13.
- Bartholomay L.C, Waterhouse R.M, Mayhew G.F, Campbell C.L, Michel K, *et al.* 2010. Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and meta-analysis of infection responses to diverse pathogens. *Science.* 330(6000):88–90
- Baume C.A, Marin MC. 2007. Intra-household mosquito net use in Ethiopia, Ghana, Mali, Nigeria, Senegal, and Zambia: are nets being used? Who in the household uses them? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(5):963–71
- Bayoh M.N, Mathias D, Odiere M, Mutuku F, Kamau L, *et al.* 2010. *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza province, Kenya. *Malar. J.* 9(1):62
- Beare R. J, Macvean M. K, Holtslag A. A, Cuxart J, Esau I, *et al.* 2006. An intercomparison of large-eddy simulations of the stable boundary layer. *Boundary-Layer Meteorology,* 118(2), 247-272.
- Beier J. 1998. Blood meal identification by direct Enzyme-Linked Immunosorbant Essay (ELISA) tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology,* 25, 9-16.
- Beier J. C, Killen G. F & Githure J. I. 1999. Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg,* 61, 109-13.
- Bejon P, Andrews L, Andersen RF, Dunachie S, Webster D, *et al.* 2005. Calculation of liver-to-blood inocula, parasite growth rates, and preerythrocytic vaccine efficacy, from serial quantitative polymerase chain reaction studies of volunteers challenged with malaria sporozoites. *J. Infect. Dis.* 191: 619–626.

- Binka F.N., Indome F, Smith T. 1998. Impact of spatial distribution of permethrin-impregnated bed nets on child mortality in rural northern Ghana. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59:80–85.
- Bloomquist J.R, Soderlund D.M. 1988. Pyrethroid insecticides and DDT modify alkaloid-dependent sodium channel activation and its enhancement by sea anemone toxin. Mol. Pharmacol. 33:543–550.
- Briët O.J, Amerasinghe P.H, Vounatsou P. 2013. Generalized Seasonal Autoregressive Integrated Moving Average Models for Count Data with Application to Malaria Time Series with Low Case Numbers. PloS One. 8(6), e65761.
- Bruce-Chwatt L.J, Draper C.C, Avramidis D, Kazandzoglou O. 1975. « Sero-Epidemiological Surveillance of Disappearing Malaria in Greece ». J. Trop. Med. Hyg. 78 (9): 194-200.
- Burkot T. R, Williams J. L, Schneider I. 1984. Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown in vitro from the same isolate. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78(3), 339-341.
- Calderaro A, Gorrini C, Peruzzi S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. 2007. Occurrence of human intestinal spirochetosis in comparison with infections by other enteropathogenic agents in an area of the Northern Italy. Diagnostic Microbial. Infect. Dis. 59(2), 157-163.
- Carlos A. G, Gikandi W. P, Tatem J. A, Noor M. A, Smith L. D, et al. 2008. The Limits and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide. PLoS Med. 5 (2): e38.
- Carnevale P, Frézil J. L, Bosseno M. F, Le Pont F, Lancien J. 1978. Etude de l'agressivité d'*Anopheles gambiae* A en fonction de l'âge et du sexe des sujets humains. Bull. World Health. Org. 56(1), 147.
- Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L, et al. 1988. [control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in burkina faso]. Bull. Soc. Pathol. Exot. Ses Fil. 81(5):832–46
- Carter R, Miller L H. 1979. « Evidence for Environmental Modulation of Gametocytogenesis in Plasmodium Falciparum in Continuous Culture ». Bull. World Health Org. 57 Suppl 1: 37-52.
- Cavalie P.H, Mouchet J. 1961. Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le nord de la république du Cameroun. Méd. Trop. 21, 847-870.

Ceesay SJ, Casals -Pascual C, Erskine J, Anya SE, Duah NO, et al. 2008. Changes In Malaria Indices Between 1999 And 2007 In The Gambia : A Retrospective Analysis. Lancet 372 (9649): 1545-1554.

Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, et al. 2000. Modifications of pyrethroid effect associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. Med. Vet. Entomol. 14, 81-88.

Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, et al. 1999. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'ivoire. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15(1):53-59

Coetzee M, Craig M, le Sueur D. 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. Parasitol. Today. 16: 74-77.

Coleman M, Mabuza A. M, Gerdalize K, Coetzee M, Durrheim N D. 2008. « Evaluation of an Operational Malaria Outbreak Identification and Response System in Mpumalanga Province, South Africa ». Malar. J. 7 (1): 69.

Collins F. H, Paskewitz S. M. 1995. Malaria: current and future prospects for control. Ann. Rev. Entomol. 40(1), 195-219.

Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco M. A. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. Bill. Zool. 52: 45-63.

Cook D. A, Levinson A. J, Garside S. 2010. Time and learning efficiency in Internet-based learning: a systematic review and meta-analysis. Adv. Health Sciences Education. 15(5), 755-770.

Coosemans M, D'Alessandro U. 2001. Pleading for insecticide treated nets in malaria control programmes. Bull. Soc. Pathol. Exot. 94(2 Pt 2):169-73

Corbel V, Akogbeto M, Damien G.B, Djenontin A, Chandre F, et al. 2012. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in benin: a cluster randomised controlled trial. Lancet Infect. Dis. 12, 617-626.

Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogb  to M, Lardeux F, et al. 2004. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. Malar. J. 3(1):22

Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, et al. 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, west Africa. Acta Trop. 101(3):207-16

- Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. 2007. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.* 23(12), 575-582.
- Covell G. 1960. Relationship between malarial parasitaemia and symptoms of the disease: a review of the literature. *Bull. World Health Org.* 22(6), 605.
- Cox-Singh J, Timothy D, Kim-Sung L, Sunita S, Asmad M, et al. 2008. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clinical Infect Dis: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 (2): 165-171.
- Coz J. 1968. La résistance des anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et à Madagascar. *Cah O.R.S.T.O.M., Ser. Ent. Méd.* vol.VI, n°3/4
- Craig GB 1967. « Genetic control of *Aedes aegypti* ». *Bull. World Health Org.* 36 (4): 628-632.
- Cuany A, Handani J, Berge J, Fournier D, Raymond M, et al. 1993. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitos. *Pest. Biochem. Physiol.* 45: 1-6.
- Curtis F, Myamba J, Wilkes TJ 1996. Comparison of different insecticides and fabrics for anti-mosquito bednets and curtains. *Med. Vet. Entomol.* 10(1):1-11.
- 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 long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J.* 7:189.
- Dabiré KR, Diabaté A, Agostinho F, Alves F, Manga L, et al. 2008. Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (*kdr*) in Guinea-Bissau, West Africa : *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 101 (2):119-123.
- Dabiré K.R, Baldet T, Diabaté A, Dia I, Costantini C, et al. 2007. *Anopheles funestus* (diptera: culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J. Med. Entomol.* 44(6):990–97
- Dabiré R, Diabaté A, Baldet T, Toé L, Guiguemdé R, et al. 2006. Personal Protection of Long Lasting Insecticide-Treated Nets in Areas of *Anopheles gambiae* s.s. Resistance to Pyrethroids ». *Malar. J.* 5 (1): 12.
- Damien G.B, Djènontin A, Rogier C, Corbel V, Bangana S.B, et al. 2010. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malar. J.* 9(1):380

- Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio J.M, Koffi A, et al. 1998. Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. Méd. Trop. Rev. Corps Santé Colon. 58(4):349–54
- Darriet F, N'guessan R, Koffi A.A, Konan L, Doannio J.M, et al. 2000. Impact de la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans la prévention du paludisme: résultats des essais en cases expérimentales avec la deltaméthrine sc. Bull. Soc. Pathol. Exot. 93(2):131–34
- Darriet F, Robert V, Tho Vien N, Carnevale P. 1984. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. OCCGE, Bobo-Dioulasso
- Davies E.E 1974. Ultrastructural studies on the early ookinete stage of *Plasmodium berghei nigeriensis* and its transformation into an oocyst. Ann. Trop. Med. Parasitol. 68: 283-290.
- De Pina J.J, Garnotel E, Hance P, Vedy S, Rogier C, Morillon M. 2007. Diagnostic of imported malaria in France. Med. Mal. Infect. 37, 710-5.
- De Souza D, Kelly-Hope L, Lawson B, Wilson M , Boakye D. 2010. Environmental Factors Associated with the Distribution of *Anopheles gambiae* s.s in Ghana; an Important Vector of Lymphatic Filariasis and Malaria. PLoS One. 5 (3): e9927.
- Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M., Dossou-yovo J, Favia G, Petrarca V & Coluzzi M 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. Insect Mol Biol, 10, 9-18.
- Della Torre A, Tu Z, Petrarca V. 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. Insect Biochem. Mol. Biol. 35(7):755–69
- Deloron P, Chougnet C. 1992. Is immunity to malaria really short-lived? Parasitol. Today 8(11):375-378.
- Dent D. H, Bagchi R, Robinson D, Majalap-Lee N, Burslem D. F. 2006. Nutrient fluxes via litterfall and leaf litter decomposition vary across a gradient of soil nutrient supply in a lowland tropical rain forest. Plant Soil. 288(1-2), 197-215.
- Detinova T, Gillies M. 1964. Observations on the determination of the age composition and epidemiological importance of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. Bull. World Health Org. 30:23–28
- Devonshire A.L, Field L.M. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. Ann. Rev. Entomol. 36, 1-23.

- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemba T.R. et al. (2002). The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67, 617–622.
- Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabiré K.R, Hougard J.M et al. (2004). 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. 9, 1267–1273.
- Diatta M, Spiegel A, Lochouarn L, Fontenille D. 1998. Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in Senegal. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92: 270-272.
- Djègbè I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, et al. 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of 11014s kdr mutation in *Anopheles gambiae* from west Africa. Malar. J. 10(1):261
- Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C. et al. 2009. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. Malar J. 8:233
- Djogbénou L, Dabiré R, Diabaté A, Kengne P, Akogbeto M. et al. 2008. 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. 78(2):298
- Djogbénou L, Noel V, Agnew P. 2010. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119s mutation. Malar. J. 9(1):12
- Djouaka R, Irving H, Tukur Z, Wondji CS. 2011. Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. PLoS ONE. 6(11):e27760
- Djouaka R.F, Bakare A.A, Coulibaly O.N, Akogbeto M.C, Ranson H. et al. 2008. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from southern Benin and Nigeria. BMC Genomics. 9(1):538
- Drakeley A.J, Roberts D, Alfirevic Z. 2003. Cervical Cerclage for Prevention of Preterm Delivery: Meta-analysis of Randomized Trials. Obstetrics & Gynecol. 102(3), 621-627.
- Drakeley C. J, Corran P. H, Coleman P. G, Tongren J. E, McDonald S. L. R. et al. 2005. Estimating Medium- and Long-Term Trends in Malaria Transmission by Using

Serological Markers of Malaria Exposure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102 (14): 5108-5113.

Drame P. M, Poinsignon A, Besnard P, Cornelie S, Le Mire J. et al. 2010. Human antibody responses to the Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. PLoS One, 5(12), e15596.

Drame P.M, Machault V, Diallo A, Cornélie S, Poinsignon A. et al. 2012. IgG Responses to the gSG6-P1 Salivary Peptide for Evaluating Human Exposure to Anopheles Bites in Urban Areas of Dakar Region, Sénégal. Malar. J. 11 (1): 72.

Druilhe P, Moreno Z, Blanc C, Brasseur P.H, Jacquier P. 2001. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 64, 233–241

Duchemin J B, Tsy J M, Rabarison P, Roux J, Coluzzi M & Costantini C 2001. Zoophily of Anopheles arabiensis and An. gambiae in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. Med Vet Entomol, 15, 50-7.

EDS III. 2006. Enquête démographique de la santé, Cotonou, INSAE.

EDS III. 2011-2012. Enquête démographique de la santé, Cotonou, INSAE.

Eisele T.P, Macintyre K, Yukich J, Ghebremeskel T. 2006. Interpreting household survey data intended to measure insecticide-treated bednet coverage: results from two surveys in Eritrea. Malar. J. 5(1):36

Ekwall H. 2003. Malaria and anemia. Current Opinion in Hematology 10, 108–114.

Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier J.Y, Yao K. 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. Annales Soc Belge Méd Trop, 73, 291-294.

Emami S.N, Ranford-Cartwright C. L, Ferguson M. H. 2013. The Impact of Low Erythrocyte Density in Human Blood on the Fitness and Energetic Reserves of the African Malaria Vector *Anopheles gambiae*. Malar. J. 12 (1): 45.

Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C. et al. 2006. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74(5):795–97

Fansiri T, Thavara U, Tawatsin A, Krasaesub S, Sithiprasasna R. 2006. Laboratory and semi-field evaluation of Mosquito Dunks® against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 37(1): 62-66.

- Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N. et al. 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. Insect Mol. Biol. 6(4):377–83
- Fanello C., Carneiro I., Ilboudo-Sanogo E., Cuzin-Ouattara N., Badolo A., Curtis C.F. 2003b, Comparative evaluation of carbosulfan and permethrin-impregnated curtains for preventing house-entry by the malaria vector *Anopheles gambiae* in Burkina Faso. *Med and Vet Entomo.* 17: 333-338.
- Fegan G.W, Noor A.M, Akhwale W.S, Cousens S, Snow R.W. 2007. Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study. *Lancet* 370, 1035-1039.
- Ferguson H.M, Rivero A, Read A.F. 2003. The influence of malaria parasite genetic diversity and anaemia on mosquito feeding and fecundity. *Parasitol.* 127, 9–19.
- Ferreira M.U, Kaneko O, Kimura M, Liu Q, Kawamoto F. et al. 1998. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in natural *Plasmodium falciparum* populations: a brief overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 631-638.
- Filisetti D, Bombard S, N’guiri C, Dahan R, Molet B. et al. 2002. Prospective assessment of a new polymerase chain reaction target (STEVOR) for imported *Plasmodium falciparum* malaria. *European J. Clinical Microbiol Infect Dis.* 21, 679-681
- Fillinger U, Lindsay S. W. 2006. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Trop. Med. Int. Health* 11(11): 1629-1642.
- Fournier D, Bride J.M, Mouches C, Raymond M, Magnin M, Berge J.B, Georghiou G.P. 1987. Biochemecal characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pest. Biochem. Physiol.* 27, 211-217.
- Fox J. 2002. Cox proportional-hazards regression for survival data. Append. R -PLUS Companion Appl. Regres.
- Frey C, Traoré C, De Allegri M, Kouyaté B, Müller O. 2006. Compliance of Young Children with ITN Protection in Rural Burkina Faso. *Malar. J.* 5 (1): 70.
- Geissbühler Y, Chaki P, Emidi B, Govella J.N, Shirima R. et al. 2007. Interdependence of Domestic Malaria Prevention Measures and Mosquito-Human Interactions in Urban Dar Es Salaam, Tanzania. *Malar. J.* 6 (1): 126.

- Genton B, Smith T, Baea K, Narara A, Al-Yaman F. et al. 1994. Malaria: how useful are clinical criteria for improving the diagnosis in a highly endemic area? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88(5), 537-541.
- Georghiou G.P, Taylor C.E. 1977. Proceedings 15th Intern. Congress Entomology. Entomological Society of America, College Park, Maryland, 759-785.
- Georghiou G.P. 1980. Insecticide resistance and prospects for its management. *Research Rev.* 76, 131-144.
- Ghosh A, Edwards M.J, Jacobs-Lorena M. 2000. The Journey of the Malaria Parasite in the Mosquito: Hopes for the New Century. *Parasitol. Today* (Personal Ed.) 16 (5): 196-201.
- Gillies MT, de Meillon B. 1968. The anophelinae of Africa south of the sahara. *South Afr. Inst. Med. Res.* 54, 343.
- Githcko A. K, Adungo N. I, Karanja D. M, Hawley W. A, Vulule J. M. et al. 1996. Some observations on the biting behavior of *Anopheles gambiae* ss, *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* and their implications for malaria control. *Experimental Parasitol.* 82(3), 306-315.
- Glare T, O'Callaghan M. 2005. A review and update of the report: Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis* israelensis, Report for new Zealand Ministry of Health.
- Gnanguenon V, Azondekon R, Oke-Agbo F, Beach R, Akogbeto MC. 2014. Durability assessment results suggest a serviceable life of two, rather than three, years for the current long-lasting insecticidal (mosquito) net (llin) intervention in Benin. *BMC Infect. Dis.* 14(1):69
- Gnanguenon V, Azondekon R, Oke-Agbo F, Sovi A, Ossè R. et al. 2013. Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets. *BMC Public Health.* 13(1):751
- Gosling R.D, Hsiang M.S. 2013. Malaria and severe anemia: thinking beyond *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.* 10(12):e1001576.
- GPIRM. 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors, Geneva, World health Organisation.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/gpirm/en/index.html>
- Grabowsky M, Farrell N, Hawley W, Chimumbwa J, Hoyer S. et al. 2005. Integrating insecticide-treated bednets into a measles vaccination campaign achieves high, rapid

- and equitable coverage with direct and voucher-based methods. *Trop. Med. Int. Health* 10(11):1151–60
- Graham K, Kayedi MH, Maxwell C, Kaur H, Rehman H. et al. 2005. Multi-country field trials comparing wash-resistance of permanettm and conventional insecticide-treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* 19(1):72–83
- Grant D.F, Matsumura F. 1989. Glutathion S-Transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pest. Biochem. Physiol.* 33, 132-143.
- Graves P.M, Ngondi J.M, Hwang J, Getachew A, Gebre T. et al. 2011. Factors associated with mosquito net use by individuals in households owning nets in Ethiopia. *Malar. J.* 10(1):354
- Greenwood B.M, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT. 2005. Malaria. *Lancet.* 365(9469):1487–98
- Greenwood B.M, Fidock D.A, Kyle D.E, Kappe S.H.I, Alonso P.L, et al. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* 118(4):1266–76
- Greenwood B, Targett G. 2009. Do We Still Need a Malaria Vaccine? *Parasit. Immunol.* 31 (9): 582-586.
- Guerra C. A, Gikandi P. W, Tatem A. J, Noor A. M, Smith D. L, Hay S. I & Snow R. W. 2008. The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med*, 5, e38.
- Guillet P, Alnwick D, Cham M.K, Neira M., Zaim M. et al. 2001. Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. *Bull. World Health Org.* 79 (10), 998.
- Guyatt H. L, Corlett S. K, Robinson T. P, Ochola S. A, Snow R. W. 2002. Malaria prevention in highland Kenya: indoor residual house-spraying vs. insecticide-treated bednets. *Trop. Med. Int. Health* 7(4), 298-303.
- Guyatt H.L, Snow W. R. 2001. The Epidemiology and Burden of *Plasmodium falciparum*-Related Anemia among Pregnant Women in Sub-Saharan Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64 (1-2 Suppl): 36-44.
- Haldar K, Mohandas N. 2009. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology / the education program of the American Society of Hematology*. Am. Soc. Hematol. Education Program 87-93.
- Hamon J, Mouchet J, Chauvet G, Lumaret R. 1963. Bilan de quatorze années de lutte contre le paludisme dans les pays francophones d'Afrique tropicale et à Madagascar:

- considérations sur la persistance de la transmission et perspectives d'avenir. Bull. Soc. Patholo. Exot. 56(5), 933-971
- Hamon J, Mouchet J. 1961. Secondary vectors of human malaria in Africa. Méd. Trop. Rev. Corps Santé Colon. 21(Special):643–60
- Hardstone M.C, Leichter C.A, Scott J.G. 2009. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monoxygenated detoxification, in mosquitoes. J. Evolutionary Biol. 22, 416-423.
- Hargreaves K, Hunt R.H, Brooke B.D, Mthembu J, Weeto M.M. et al. 2003. *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in south Africa. Med. Vet. Entomol. 17(4):417–22
- Hargreaves K, Koekemoer L.L, Brooke B.D, Hunt R.H, Mthembu J. et al. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in south Africa. Med. Vet. Entomol. 14:181 – 189
- Hawley W.A, Phillips-Howard P.A, ter Kuile F.O, Terlouw D.J, Vulule J.M. et al. 2003. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in Western Kenya ». Am. J. Trop. Med. Hyg. 68 (4 Suppl): 121 - 127.
- Hay D. L, Poyner D. R, Quirion R. 2008. International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptor. Pharmacological Rev. 60(2), 143-145.
- Hay SI. 2005. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. Nat. Rev Microbiol. 3:81–90
- Hemingway J, Field L, Vontas J. 2002. An overview of insecticide resistance. Science 298(5591), 96-97.
- Hemingway J, Hawkes N.J, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem. Mol. Biol. 34:653 – 665
- Henry M.C, Assi S.B, Rogier C, Yovo D.J, Chandre F. et al. 2005. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Côte d'Ivoire. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73:859 – 864
- Hetzel M.W, Pulford J, Paul S, Tarongka N, Morris H. et al. 2012. «Dramatic changes in malaria after the free distribution of mosquito nets in Papua New Guinea ». Malar. J. 11 (Suppl 1): O46.
- Hommel M, Schrével J. 1998. Malaria, microtubules and merozoite invasion. Parasitol. Today 14(1), 6-7.

- Howard S. C, Omumbo J, Nevill C, Some E. S, Donnelly C. A. et al. 2000. Evidence for a mass community effect of insecticide-treated bednets on the incidence of malaria on the Kenyan coast. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 357–360
- Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique (INSAE), ICF International. 2012. Enquête démographique et de santé et à indicateurs multiples du Bénin eds-mics-iv 2011-2012. Cotonou
- INSAE. 2002. 3^{ème} Recensement Général de la Population du Bénin.
- Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. 2004. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol.* 2:E4.
- Jiang J. B, Bray R. S, Krotoski W. A, Canning E. U, Liang D. S, Huang J. C, Liao J. Y, Li D. S, Lun Z. R & Landaul. 1998. Observations on early and proguanil upon tissue hypnozoites and schizonts of *Plasmodium cynomolgi bastianellii*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82, 56-8.
- Jones C.M, Toé K.H, Sanou A, Namountougou M, Hughes A. et al. 2012. Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS One* 7 (9): e45995.
- Jones C.S, Tiffany L, Michael H, Miller T, James A. G. et al. 2013. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 97(5): 1987-1995.
- Kelly-Hope L. A, McKenzie F. E. 2009. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar. J.* 8(1), 19.
- Kilian A, Byamukama W, Pigeon O, Atieli F, Duchon S. et al. 2008. Long-term field performance of a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in rural Uganda. *Malar. J.* 7(1):49
- Kilian A, Hannah K, Ebenezer B, Emmanuel O. O, Richmond A. S. et al. 2013. Universal coverage with insecticide-treated nets – Applying the revised indicators for ownership and use to the Nigeria 2010 malaria indicator survey Data. *Malar. J.* 12 (1): 314.
- Kilian A. 2012. Textile testing methods for nets
- Killeen T, Brady K.T. 2000. Parental stress and child behavioral outcomes following substance abuse residential treatment: Follow-up at 6 and 12 months. *J. Substance Abuse Treatment* 19(1), 23-29.

- Killeen G.F, Smith T.A. 2007. « Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality ». *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101 (9-4): 867-880.
- Kindé-Gazard D, Gbénou D, Tohon C, Da Silva C, Nahum A. et al. 2004. Indicateurs de suivi et d'évaluation en 2001 de l'initiative «Faire reculer le paludisme» au Bénin. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 97, 349-352.
- Kitua A.Y, Smith T.A, Alonso P.L, Urassa H, Masanja H. et al. 1997. The role of low level *Plasmodium falciparum* parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission. *Trop. Med. Int. Health* 2(4), 325-333.
- Klinkenberg E, McCall P. J, Amerasinghe F.P. W, Donnelly J.M. 2008. Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana. *Malar. J.* 7 (1): 151.
- Knox T.B, Juma O.E, Ochomo O.E, Jamet P.H, Ndungo L. et al. 2014. An online tool for mapping insecticide resistance in major anopheles vectors of human malaria parasites and review of resistance status for the Afrotropical Region. *Parasit. Vectors* 7 (1): 76.
- Kouadio I. K, Aljunid S, Kamigaki T, Hammad K, Oshitani H. 2012. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10(1):95-104.
- Koudou B, Ghattas H, Essé C, Nsanzabana C, Rohner F. et al. 2010. The use of insecticide-treated nets for reducing malaria morbidity among children aged 6-59 Months, in an area of high malaria transmission in central Côte d'Ivoire. *Parasit. Vectors* 3 (1): 91.
- Kumar A, Sharma V.P, Thavaselvam D, Sumodan P.K, Kamat R.H. et al. 1996. Control of *Culex quinquefasciatus* with *Bacillus sphaericus* in Vasco City, Goa. Vector Control Research Center, Indira Nagar, Pondicherry, India. Malaria Research Centre (ICMR), Panaji, Goa, India. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 12, 409-413.
- Kwiatkowski D, Marsh K. 1997. Development of a malaria vaccine. *The Lancet*, 350(9092), 1696-1701.
- Lacroix M. B. 2005. Le groupe du groupe... groupenfants, grouparents. Petite enfance et parentalité, 227-233.
- Laishram D.D, Sutton P.L, Nanda N, Sharma L.V, Sobti C. R. et al. 2012. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar. J.* 11 (1): 29.
- Lamikanra A.A, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J. et al. 2007. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110, 18–28.

- Le Goff G, Toto J.C, Nzeyimana I, Gouagna L.C, Robert V. 1993. Les moustiques et la transmission du paludisme dans un village du bloc forestier sud-Camerounais. Bull. de Liakoiolz et de Docurmxtwiiotz, 26, 133-137.
- Lengeler C, International Development Research Centre (IDRC), World Health Organization (WHO). 1996. Net gain: a new method for preventing malaria deaths. Ottawa, ON: IDRC. 189 pp.
- Lengeler C. 2004. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. Cochrane Database Syst. Rev. Online, p. CD000363
- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie, Edition De boeck Université, Bruxelles Belgique, 415 pp.
- Lindsay D. S, Thomas N. J, Dubey J. P. 2000. Biological characterisation of *Sarcocystis neurona* isolated from a Southern sea otter *Enhydra lutris nereis*. Int. J. Parasitol. 30(5), 617-624.
- Lindsay S.W, Gibson M.E. 1988. Bednets revisited— old idea, new angle. Parasitol. Today. 4(10):270–72
- Lines J.D. 1996. The technical issues. In: Lengeler C, Cattani J, deSavigny DH editor(s). Net gain: a new method to prevent malaria deaths. Ottawa: International Development Research Centre, 17–53.
- Lombardi L, Newcomb E. W, Dalla-Favera R. 1987. Pathogenesis of *Burkitt lymphoma*: Expression of an activated oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. Cell. 49(2), 161-170.
- Lynd A, Ranson H, McCall P.J, Randle N.P, Black W.C. et al. 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. Malar. J. 4(1):16
- Malcolm C.A. 1988. Current status of pyrethroid resistance in anophelines. Parasitol. Today. 4 (7), 13-16.
- Manga, M, Wang, C.-Y, 2007. Earthquake hydrology. In: Kanamori, H. (Ed.), Earthquake Seismology. Treatise on Geophysics, vol. 4. Elsevier, Amsterdam, pp. 293–320
- Marbiah N.T, Petersen E, David K, Magbity E, Lines J. et al. 1998. A controlled trial of lambda-cyhalothrin-impregnated bed nets and/or dapsone/pyrimethamine for malaria control in Sierra Leone. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 1-6.
- Mathenge E. M, Misiani G. O, Oulo D. O, Irungu L. W, Ndegwa P. N. et al. 2005. Comparative performance of the Mbita trap, CDC light trap and the human landing catch in the sampling of *Anopheles arabiensis*, *An. funestus* and culicine species in a rice irrigation in western Kenya. Malar. J. 4(1), 7.

- Matowo J, Kitau J, Kabula B, Kavishe R. A, Oxborough R. M. et al. 2014. Dynamics of insecticide resistance and the frequency of kdr mutation in the primary malaria vector *Anopheles arabiensis* in rural villages of Lower Moshi, North Eastern Tanzania. *J. Parasitol. Vector Biol.* 6(3), 31-41.
- McIver S. B. 1982. Sensilla mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 19, 489-535.
- Menendez C, Ordi J, Ismail M. R, Ventura P. J, Aponte J. J. et al. 2000. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J. Infect. Dis.* 181 (5): 1740-1745.
- Ministère de la santé. 2011. Rapport Bénin de la première année d'étude, projet Gate/OMS. Ministère de la Santé, Cotonou
- Ministère de la Santé de la République du Bénin. Annuaire des statistiques sanitaires *SNIGS/DPP/MS*, 2011, 141pp.
- Ministère de la Santé de la République du Bénin. Annuaire des statistiques sanitaires *SNIGS/DPP/MS*, 2012, 148pp.
- Moiroux N, Boussari O, Djènontin A, Damien G, Cottrell G. et al. 2012. Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin, West Africa. *PLoS One* 7 (1): e30558.
- Molineaux L. 1997. Malaria and mortality: some epidemiological considerations. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91(7), 811-826
- Mouchés C, Pasteur N, Berge J.B, Hyrien O, Raymond M. et al. 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California Culex mosquito. *Science* 233, 778-780.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S. et al. 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. Paris: John Libbey Eurotext
- Mouchet J, Cavalié P, Caillies J. M, Marticou M. 1961. L'irritabilité vis-à-vis du DDT d'*Anopheles gambiae* et d'*An. funestus* dans le Nord-Cameroun. *Rivista di Malariologia* 40(4-6), 1-27.
- Mouchet J, Hamon J. 1963. Les problèmes techniques de l"éradication du paludisme en Afrique. *Cah. Orstom, Sér. Entomol. Méd.* 33, 39-48.
- Muller P. 1955 DDT, das insektizid dichlorophenytrichloroethan und seine bedeutung. Basel: Birrklaüser. 29-89.

- Müller O, Jahn A. 2003. Editorial: expanding insecticide-treated mosquito net coverage in Africa: tradeoffs between public and commercial strategies. *Trop. Med. Int. Health.* 8(10):853–56
- Murray C.K, Robert A.G, Alan J. M, Scott Miller R. 2008. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 21 (1): 97- 110.
- Mutuku F.M, Khambira M, Bisanzio D, Mungai P, Mwanza I. et al. 2013. Physical condition and maintenance of mosquito bed nets in Kwale county, coastal Kenya. *Malar. J.* 12(1):46
- N'Guessan R, Corbel V, Bonnet J, Yates A, Asidi A. et al. 2007. Evaluation of indoxacarb, an oxadiazine insecticide for the control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* (diptera: culicidae). *J. Med. Entomol.* 44(2):270–76
- Newton C.R. J. C, Tran T.H, Nicholas W. 2000. Cerebral malaria. *J. Neurol. Neurosurgery & Psychiatry* 69 (4): 433-441.
- Nkya T.E, Akhouayri I, Poupartin R, Batengana B, Mosha F. et al. 2014. « Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: A case study in Tanzania ». *Malar. J.* 13 (1): 28.
- Odiere M, Bayoh J, Gimnig J, Vulule L, Irungu. et al. 2007. Sampling outdoor, resting *Anopheles gambiae* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya with clay pots. *J. Med. Entomol.* 44 (1): 14-22.
- Okiro E.A, Snow R.W. 2010. The relationship between reported fever and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Malar. J.* 9:99
- de Oliveira IM, et al. (2010) The role of two putative nitroreductases, Frm2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27(2):89-102
- Oliveira-Ferreira J, Marcus V.G.L, Brasil P, Ladislau L.B. J, Tauil L.P. et al. 2010. Malaria in Brazil: An Overview. *Malar. J.* 9 (1): 115.
- Oliver R, Roberts GJ, Hooper L. 2004. Penicillins for the prophylaxis of bacterial endocarditis in dentistry.The Coch-rane Database of Systemic Reviews Art. No.: CD003813.pub2. DOI: 10.1002/14651858.CD003813.pub2. Pp. 7–20
- OMS. 1957. Comité d'experts du paludisme, 6e édition. Genève : OMS-Série Rapport technique n° 123 : 4-5.
- OMS. 2002. La communication pour agir sur les comportements et faire reculer le paludisme (archive) ». 2014. WHO. Consulté le juin 13.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpe_smt_2002_17/fr/.

- OMS. 2011. Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde. WHO.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/fr/
- Ossè R, Aikpon R, Padonou G.G, Oussou O, Yadouléton A. et al. 2012a. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. Parasit. Vectors. 5(1):163
- Ossè R, Gnanguenon V, Sèzonlin M, Aikpon R, Padonou G. et al. 2012b. Relationship between the presence of kdr and ace-1 mutations and the infection with *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s. in Benin. J. Parasitol. Vector Biol. 4(3):3139
- Ossè R.A, Aïkpon R, Gbédjissi G.L, Gnanguenon V, Sèzonlin M. et al. 2013. A shift from indoor residual spraying (irs) with bendiocarb to long-lasting insecticidal (mosquito) nets (llins) associated with changes in malaria transmission indicators in pyrethroid resistance areas in Benin. Parasit. Vectors. 6(1):73
- Otten M, Aregawi M, Were W, Karema C, Medin A. et al. 2009. Initial evidence of reduction of malaria cases and deaths in Rwanda and Ethiopia due to rapid scale-up of malaria prevention and treatment. Malar. J. 8 (1): 14.
- Owino R. O, Masiga M.A, Macigo F. G. 2010. Dental caries, gingivitis and the treatment needs among 12-year-olds. East Afri. Med. J. 87(1), 25-31.
- Padonou G, Sezonlin M, Gbedjissi G, Ayi I, Azondekon R. et al. 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
- Perera M.D.B, Hemingway J, Karunaratne S. 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. Malar. J. 7, 168.
- Pérez B.C, Teixeira C, Figueiras M, Gut J, Rosenthal PJ. et al. 2012. Novel cinnamic acid/4-aminoquinoline conjugates bearing non-proteinogenic amino acids: towards the development of potential dual action antimalarials. Eur. J. Med. Chem. 367(22):2110-8
- Phillips R.S. 2001. Current status of malaria and potential for control. Clin. Microbiol. Rev. 14 (1): 208-226.
- PNLP. 2009. Rapport LQAS. 49 pp.
- PNLP. 2010. Evaluation finale du projet d'appui à la lutte contre le paludisme. Cotonou; 42 pp.
- PNLP. 2011. Evaluation post campagne de la distribution gratuite de MIILD en 2011 au Benin. Cotonou

PNLP. 2011. Plan Stratégie National de Lutte contre le Plaudisme en 2011 au Benin. Cotonou 70pp.

PNLP. 2012. Campagne de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action aux ménages du Bénin. Ministère de la Santé, Cotonou

Poinsignon A, Cornelie S, Ba F, Boulanger D, Sow C. et al. 2009. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to anopheles bites. *Malar. J.* 8 (1): 198.

Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M. et al. 2008. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to anopheles bites. *PLoS One* 3(6), e2472.

Poupardin R. 2011. Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble 1, 275pp.

Pradhan P. 2009. Malarial anaemia and nitric oxide induced megaloblastic anaemia: a review on the causes of malarial anaemia». *J. Vector Borne Dis.* 46 (2): 100-108.

Prakash M. et al. 2008. Surface Tension Transport of Prey by Feeding Shorebirds: The Capillary Ratchet Science 320: 930-934

Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman A.J. 1995a. DDT resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT deshydrochlorinase activity of Glutathione-S-Transferases. *Bull. Entomol. Res.* 85, 267-274.

Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman A.J. 1995b. Partial purification and characterization of Glutathione-S-Transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 47, 119-133.

Protopopoff N, Van Bortel W, Speybroeck N, Van Geertruyden J. P, Baza D. et al. 2009. Ranking malaria risk factors to guide malaria control efforts in African highlands. *PLoS One* 4(11), e8022.

RBM. 2011. Children and malaria. RBM infosheet, (3).

Rafinejad J, Vatandoost H, Nikpoor F, Abai M.R, Shaeghi M. et al. 2008. Effect of washing on the bio-efficacy of insecticide-treated nets (itns) and long-lasting insecticidal nets

(LLINs) against main malaria vector *Anopheles stephensi* by three bioassay methods. J. Vector Borne Dis. 45(2):143

Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo W.M, Kerah-Hinzoumbé C. et al. 2009. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. Malar. J. 8(1):299

Ranson H, Jensen B, Vulule J.M, Wang X, Hemingway J. et al. 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.

Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z. et al. 2011. Pyrethroid resistance in african anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? Trends Parasitol. 27(2):91–98

Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve J. P. et al. 2006. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 100(4), 363-370.

Rickman S, Jones R, Long W, Paparello S, Schneider I. et al. 1990. *Plasmodium falciparum*-infected *Anopheles stephensi* inconsistently transmit malaria to humans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43: 441-445.

Robert V, Le Goff G, Toto J. C, Essong J. & Verhave J. P. 1994. Early sporogonic development in local vectors of *Plasmodium falciparum* in rural Cameroon. Mem Inst Oswaldo Cruz, 89 Suppl 2, 23-6.

Robert V, Kate M, Keating J, Trape J, Duchemin J.B. et al. 2003b. Malaria transmission in urban sub-saharan Africa. The Am. J. Trop. Med. Hyg. 68 (2): 169-176.

Robert V, Le Goff G, Andrianaivolambo L, Randimby M. F, Domarle O. et al. 2006. Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar. Int. J. Parasitol. 36, 1273–1281

Rodhain F, Perez C. 1985. Outline of medical and veterinary entomology. Data on the epidemiology of vector-borne diseases. Maloine.

Rogerson S.J, Brown H.C, Pollina E, Abrams T.E, Lema V.M. et al. 2003. Placental tumour necrosis factor alpha but not interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. Infect. Immun. 71: 267-270.

Rogier C. 2003. Childhood malaria in endemic areas: epidemiology, acquired immunity and control strategies. Med Trop (Mars), 63, 449-64.

- Rogier C, Henry M. C, Rowland M, Carnevale P, Chandre F. et al. 2009a. « [Guidelines for phase III evaluation of vector control methods against malaria] ». Méd. Trop. revue du Corps de santé colonial 69 (2): 173-184.
- Rogier C, Henry M.C, Trape J.F. 2009b. Epidemiologic evaluation of malaria in endemic areas. Méd. Trop. revue du Corps de santé colonial 69 (2): 123-142.
- Rogier C, Tall A, Diagne N, Fontenille D, Spiegel A. et al. 1999. *Plasmodium falciparum* clinical malaria: lessons from longitudinal studies in Senegal. Parassitologia 41(1/3), 255-260.
- Rooker S, Guillemaud T, Berge J, Pasteur N, Raymond M. 1996. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. Heredity 77, 555-561.
- Ross R. 1898. Du rôle des moustiques dans le paludisme. Charaire.
- Ross R. 1906. Notes on the parasites of mosquitoes found in India between 1895 and 1899. J. Hyg. 6(02), 101-108.
- Rubio J.M, Buhigas I, Subirats M, Baquero M, Puente S. et al. 2001. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. J. Clin. Microbiol. 39, 2736–2737.
- Rubio Y, Curtis C. F. 1992. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. Med. Vet. Entomol. 6(4), 325-334.
- Schofield L. & Hackett F. 1993. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. J Exp Med, 177, 145-53.
- Scott J.A, Brogdon W.G, Collins F.H. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49(4):520
- Sargent E. 1950. Traité élémentaire d'exploration clinique médicale: publié par Émile Sargent et MM. Francis Bordet, P. Cottenham, Paul George, René Hazard, Raoul d'Heucqueville...[Etc. Préface du Dr Emile Sargent. Lettre-préface du Dr Just Lucas-Championnière.] 4e édition. [Introduction par le Dr L. Ribadeau-Dumas.]. Masson
- Shackley M. 2006. Africa: slavery and safari. In Atlas of Travel and Tourism Development, 45–64. Elsevier
- Shanks G.D, Hay S.I, Stern D.I, Biomndo K, Snow R.W. 2002. Meteorologic influences on *Plasmodium falciparum* malaria in the highland tea estates of kericho, western Kenya. Emerg. Infect. Dis. 8(12):1404–8

- Shaukat A.M, Breman J.G, McKenzie F. E. 2010. Research using the entomological inoculation rate to assess the impact of vector control on malaria parasite transmission and elimination. *Malar. J.* 9:122
- Sinka M, Bangs M, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T. et al. 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit. Vectors.* 5 (1): 69.
- Sithiprasasna R, Jaichapor B, Chanaimongkol S, Khongtak P, Lealsirivattanakul T. et al. 2004. Evaluation of candidate traps as tools for conducting surveillance for Anopheles mosquitoes in a malaria endemic area in western Thailand. *J. Med. Entomol.* 41, 151–157.
- Smith B, Ceusters W, Klagges B, Köhler J, Kumar A. et al. 2005. Relations in biomedical ontologies. *Genome Biol.* 6(5), R46
- Smith D.L. 2007. Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control. *PLoS Biol.* 5:e42
- Smith R.K, Brickhouse N.S, Liedahl D.A, Raymond J. C. 2001. Collisional plasma models with APEC/APED: Emission-line diagnostics of hydrogen-like and helium-like ions. *The Astrophysical J. Letters.* 556(2), L91.
- Smith T, Beck H.P, Kitua A, S Mwankusye I.F, Fraser-Hurt N. et al. 1999. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity . *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 15-20.
- Snounou G, Beck H. P. 1998. The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol. Today.* 14(11), 462-467.
- Snow R.W, Guerra C. A, Noor A.M, Myint H. Y, Hay S. I. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434(7030):214-217.
- Snow R.W, Guerra C.A, Mutheu J.J, Hay SI. 2008. International funding for malaria control in relation to populations at risk of stable *Plasmodium falciparum* transmission. *PLoS Med.* 5(7):e142
- Snow R.W. 1987. Bed-nets and protection against malaria. *The Lancet* 329 (8548): 1493-1494.
- Soderlund D.M, Bloomquist J.R. 1990. Pesticide resistance in arthropods. New York: Roush, R. T. & Tabashnik, B. E. (eds). Chapman and Hall, 58pp.
- Sovi A, Azondékon R, Aïkpon R.Y, Govoétchan R, Tokponnon F. et al. 2013a. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasit. Vectors.* 6(1):319

- Sovi A, Govoétchan R, Tokponnon F, Houkonnou H, Aïkpon R. et al. 2013b. Impact of land-use on malaria transmission in the plateau region, southeastern Benin. *Parasit. Vectors.* 6(1):352
- Sovi A, Djègbè I, Soumanou L, Tokponnon F, Gnanguenon V, Azondékon R, et al., 2014. Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) *BMC Infect. Dis.* 14:103
- Stevens E.R, Aldridge A, Degbey Y, Pignandi A, Dorkenoo MA. et al. 2013. Evaluation of the 2011 long-lasting insecticide-treated net distribution for universal coverage in Togo. *Malar. J.* 12(1):162
- Struik S. S, Riley E. M. 2004. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol. Rev.* 201(1), 268-290
- Stump A.D, Atieli F.K, Vulule J.M, Besansky N.J. 2004. Dynamics of pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70:591-596.
- Takken W, Bart G.J.K. 2009. « Malaria vector control: current and future strategies ». *Trends Parasitol.* 25 (3): 101-104.
- Taylor P.J, Hurd H. 2001. The influence of host haematocrit on the blood feeding success of *Anopheles stephensi*: implications for enhanced malaria transmission. *Parasitol.* 122:491–496.
- Taylor T. E, Fu W. J, Carr R. A, Whitten R. O, Mueller J, Fosiko N. G, Lewallen S, Liomba N. G & Molyneux M. E. 2004. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med*, 10, 143-5.
- Teuscher T, Armstrong Schellenberg J. R. M, Bastos de Azevedo I, Hurt N, Smith T. et al. 1994. SPf66, a chemically synthesized subunit malaria vaccine, is safe and immunogenic in Tanzanians exposed to intense malaria transmission. *Vaccine* 12(4), 328-336.
- Thwing J, Hochberg N, Vanden Eng J, Issifi S, Eliades M.J. et al. 2008. Insecticide-treated net ownership and usage in Niger after a nationwide integrated campaign. *Trop. Med. Int. Health.* 13(6):827–34

- Toé L, Skovmand O, Dabiré K, Diabaté A, Diallo Y. et al. 2009. Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. *Malar. J.* 8(1):175
- Tokponnon F.T, Aholoukpe B, Denon E.Y, Gnanguenon V, Bokossa A. et al. 2013. Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. *Parasit. Vectors.* 6:265
- Toure Y.T, Petrarca V, Coluzzi M. 1983. Nuove entità del complesso *Anopheles gambiae* in Mali. *Parassitologia* 25, 367-370.
- Trape J.F. 2001. Contre: les limites des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 94(2):174–79
- Trape J-F, Tall A., Diagne N, Ndiath, Ly A.B., Faye J, Dieye-Ba F, Roucher C, Bouganali C, Badiane. et al., 2011. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lan. Infect. Dis.* 11: 925–932.
- Vulule J.M, Beach R.F, Atieli F.K, Roberts J.M, Mount D.L. et al. 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.
- Webster L.T. 1992. Drugs used in chemotherapy of protozoal infection: malaria, in the pharmacological basis therapeutics Goodman. A G., Rall, T.w., Nies, A.S, Taylor, P. Goodman & Gilan's Vol. 2, 8 ed. New York, Mc Graw. Hill intentional Edition. Medical series.
- West P.A, Protopopoff N, Rowland M.W, Kirby M.J, Oxborough R.M. et al. 2012. Evaluation of a national universal coverage campaign of long-lasting insecticidal nets in a rural district in north-west Tanzania. *Malar. J.* 11(1):273
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A. et al. 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.* 13(1):1–7.
- White N J. 2004. Sharing Malaria. *Lancet* 363 (9414): 1006.
- White N. J, Ho M. 1992. “The Pathophysiology of malaria”. *Adv Parasitol.* 31: 83-173.
- WHO. 1976. Resistance of disease vectors to pesticides. WHO/VBC/76.609, 10pp.
- WHO. 1996. Weekly epidemiological record/releve épidémiologique hebdomadaire, Geneva, World health Organisation. http://www.who.int/docstore/wer/71_27_52.html

- WHO. 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual) (archived) ». 2014. WHO. Consulté le juin 20.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpc_mal_98_6/en/.
- WHO. 2000. The world health report, health systems : improving performance, Geneva, World Health Organization.
- WHO. 2005. World Malaria Report, Geneva, World health Organisation.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241593199/en/>
- WHO. 2006a. Paludisme : lutte antivectorielle et protection individuelle : rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS, Genève, Organisation mondiale de la Santé
- WHO. 2006b. Malaria vector control and personal protection report of a WHO Study Group, Geneva, World Health Organization
- WHO. 2008a. 2007 UNAIDS annual report: knowing your epidemic. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), Geneva, World health Organisation.
- WHO. 2008b. World Malaria Report, Geneva, World health Organisation.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>
- WHO. 2009. World Malaria report, Geneva, World Health Organization.
- WHO. 2010. World Malaria Report, Geneva, World health Organisation.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html
- WHO. 2011. Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions, Geneva, World Health Organization.
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/44610>
- WHO. 2011. World Malaria Report, Geneva, World health Organisation.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/
- WHO. 2012. World Malaria Report, Geneva, World health Organisation.
http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/
- WHO. 2013. World Malaria Report, Geneva, World health Organisation.
http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/
- WHO-UNICEF. 2003. Rapport sur le paludisme en Afrique, Geneva, World Health Organization.<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/whocdsmal20031093/fr/>.
- Wirth M.C, Marquine M, Georghiou G.P, Pasteur N. 1990. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. J. Med. Entomol. 27(2), 202-206.

- Wirtz R, Ballou W, Schneider I, Chedid L, Gross M. et al. 1987. *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli*. Exp. Parasitol. 63(1):166–172.
- Wiseman V, Scott A, McElroy B, Conteh L, Stevens W. 2007. Determinants of bed net use in the Gambia: implications for malaria control. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76(5):830–36
- Wongsrichanalai C, Barcus M. J, Muth S, Sutamihardja A & Wernsdorfer W. H. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Am J Trop Med Hyg, 77, 119-27.
- Yadouleton A, Asidi A, Djouaka R, Braïma J, Agossou C. et al. 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(1):103
- Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A. et al. 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. Parasit. Vectors. 4(1):60
- Yadouleton A.W, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S. et al. 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. Malar. J. 9:83
- Ye Y, Patton E, Kilian A, Dovey S, Eckert E. 2012. Can universal insecticide-treated net campaigns achieve equity in coverage and use? The case of northern Nigeria. Malar. J. 11(1):32
- Zaim M, Aitio A, Nakashima N. 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med. Vet. Entomol. 14(1):1–5
- Zaim M, Guillet P. 2002. Alternative insecticides: an urgent need. Trends Parasitol. 18(4)
- Zwetyenga J, Regier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape J. F. et al. 1999. A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 93(4), 375-380.



Annexes

Annexes 1 : Articles publiés

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs)

Arthur Sovi^{1*}, Innocent Djègbè², Lawal Soumanou¹, Filémon Tokponnon³, Virgile Gnanguenon¹, Roseric Azondékon⁴, Frédéric Oké-Agbo¹, Mariam Okè³, Alioun Adéchoubou³, Achille Massougbedji⁵, Vincent Corbel^{6,7} and Martin Akogbéto¹

Abstract

Background: This study aims to research two areas, one with a resistant and the other with a susceptible profile of *An. gambiae* to deltamethrin in the region of Plateau (southern Benin). In each area, eight localities were sought. Both areas were needed for the assessment of the impact of malaria vector resistance to pyrethroids on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). The susceptible area of *An. gambiae* to deltamethrin was used as a control.

Methods: In total, 119 localities in the region of Plateau were screened by sampling *An. gambiae* s.l. larvae. Female mosquitoes resulting from these larvae were exposed to 0.05% deltamethrin following WHO standards. PCR was used to identify species and molecular forms of the dead and alive mosquitoes. Finally, we identified *kdr* mutations (1014 F and 1014S) using the HOLA technique.

Results: Fifty-six out of 119 prospected localities tested positive for *Anopheles gambiae* s.l. breeding sites. The results showed that *An. gambiae* was resistant to deltamethrin in 39 localities and susceptible in only 2 localities; resistance to deltamethrin was suspected in 15 localities. The HOLA technique confirmed the presence of *kdr* 1014 F mutation and the absence of *kdr* 1014S mutation. The *kdr* 1014 F mutation was found in both M and S molecular forms at relatively high frequencies therefore confirming the susceptibility tests.

Conclusion: We were unable to identify the eight susceptible areas due to the overall resistance of *An. gambiae* to deltamethrin in the region of Plateau. To implement the study, we kept two areas, one with high resistance (R^{+++}) and the other with low resistance (R^+) of *An. gambiae* to deltamethrin.

Keywords: *An. gambiae* s.s, Deltamethrin, Insecticide resistance, *kdr* mutation, Plateau, Benin

* Correspondence: sart52005@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Benin

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

Background

Benin, like many other African countries, has based its vector control strategy on two major interventions: universal access to Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and Indoor Residual Spray (IRS). Thus, in late July 2011, a large scale distribution of LLINs had been conducted by Benin National Malaria Control Program (NMCP) with the support of the World Bank, the US President's Malaria Initiative (PMI) and the World Health Organization (WHO). Another distribution campaign had already been conducted in October 2007 to ensure a partial and selective coverage in two types of LLINs, PermaNet® and OlysetNet® respectively impregnated with deltamethrin and permethrin. A national survey assessing the 2007 campaign revealed that 56.3% of children under 5 years and 54.8% of pregnant women slept under a LLIN the night before the survey [1]. The current study carried out between April and early July 2011 had taken place between the two aforementioned distribution campaigns.

Insecticide resistance has become widely distributed in Western [2-5], Eastern [6], Central [7] and Southern Africa [8]. This could be a serious obstacle to the effectiveness of LLINs. This raises an important question within National Malaria Control Programmes (NMCPs): should we continue to promote LLINs? The question has been explored by N'Guessan *et al.* [9] who demonstrated a decrease in the effectiveness of LLINs and lambdacyhalothrin IRS in an area of high resistance of *Anopheles gambiae* in Southern Benin. They compared the effectiveness of mosquito nets in two areas, one area with resistant *An. gambiae* populations to pyrethroids and one other where *An. gambiae* is susceptible to pyrethroids. However, the study was conducted on an experimental scale using experimental huts. It is therefore difficult to predict what would happen at a community level.

For that reason, a large scale study investigating the impact of malaria vector resistance to pyrethroids on the effectiveness of LLINs was initiated in late July 2011. In the context of universal access to LLINs, the implementation of such an impact study requires the identification of two areas: one area where *An. gambiae* was highly resistant to pyrethroids, and one other where *An. gambiae* was still susceptible to pyrethroids. The latter area would serve as a control area. The main objective of this article is the determination of these two areas. This will allow the comparison of the effectiveness of LLINs between the two areas.

The results of a previous study conducted in forty districts in Southern Benin revealed that the entire region is covered by pyrethroids resistant populations of *An. gambiae* [5]. However, a few pockets of susceptible populations of *An. gambiae* has been reported in two districts (Ifangni and Adja-wèrè) located in the region of Plateau [5]. This is why we selected this region for the

implementation of our impact study. However, we decided to randomly implement the study in 16 localities (8 localities constituting the resistant area and 8 others representing the susceptible area). We then multiplied larval prospections and susceptibility tests in many localities across four districts within the region of Plateau. Unfortunately, we were unable to identify the 8 localities of high susceptibility of *An. gambiae* as previously expected. We then decided to replace the susceptible area by an area where *An. gambiae* has a low resistance [low resistant area (R^+ area) vs high resistant (R^{++} area)].

Regarding the susceptibility tests, we had the choice between deltamethrin and permethrin, two insecticides used to impregnate PermaNet® and OlysetNet®. We ended up choosing deltamethrin. This choice has been motivated by evidence suggesting a wide distribution of high vector resistance to permethrin in Southern Benin [5]. Under these conditions, we believed that the probability to identify localities where *An. gambiae* is susceptible to permethrin is low.

From April to early July 2011, we conducted several field missions across four districts in the region of Plateau. Results from the susceptibility tests helped classify the localities between the two resistant (R^+ and R^{++}) areas. In both R^+ and R^{++} areas, a study of malaria transmission and vector behavior had been implemented.

Methods

Study area

The study was conducted in the region of Plateau in the south-east of Benin and specifically in the districts of Ifangni, Sakété, Pobè and Kétou. This region has an area of 3,264 km², with a total population of 407,116 inhabitants [10]. Fifty-six localities which tested positive for *An. gambiae* larvae are mostly rural and represent 31.3% (56/179) of the localities of the four districts to which they belong, which total area is 2,849 km² [10]. The climate in the Plateau region is Guinean with two rainy seasons and two dry seasons. The region records an annual rainfall between 800 mm and 1200 mm in its western part and between 1000 mm and 1400 mm in its eastern part. The cropping system is characterized by the practice of two annual growing seasons associated with rainfall patterns. Corn crop is predominant. The whole area is strewn with swamps. These swamps are used for the production of off-season crops and the installation of ground farms for various species. Different economic activities take place in the region of Plateau because of the opportunities offered by the natural environment but also its closeness to Nigeria, which has a polarizing action in the region. The region of Plateau abounds with farmers and traders.

Collection and breeding of larvae and pupae of *Anopheles* mosquitoes

From April to early July 2011, 119 localities were prospected in all four districts, of which 56 tested positive for *Anopheles* breeding sites. Localities which tested positive were geo-referenced using a Global Positioning System (GPS).

Larvae and pupae of *An. gambiae* were collected in collections of water using the "dipping" technique [11]. This technique consists of collecting larvae and pupae, using a simple ladle, from positive breeding sites. Larvae and pupae were kept separately in labeled bins and taken to the insectary of the "Centre de Recherche Entomologique de Cotonou" (CREC) for rearing. After emergence, adults of 2 to 5 days old were used for susceptibility testing in the laboratory.

Susceptibility tests

Susceptibility tests were performed according to the WHO susceptibility tube-test with unfed female *Anopheles*, aged 2 to 5 days. These tests were performed with paper impregnated with deltamethrin at the diagnostic dose of 0.05%.

Batches of 25 female mosquitoes aged 2 to 5 days were added to each tube carpeted with deltamethrin impregnated paper for 60 minutes. Batches exposed to untreated papers were used as control. Mosquitoes of the susceptible Kisumu strain were exposed to deltamethrin (0.05%) treated filter papers. The number of field mosquitoes knocked down as a result of the insecticide effect was recorded every ten minutes during the exposure time period. After 60 minutes of exposure, mosquitoes were transferred to the observation tubes and fed with a 10% honey solution and kept under observation for 24 hours. At the end of the observation time, mortality rates were determined. These rates were construed in accordance with the recommended criteria by WHO [12]. The resistance status was determined based on the following criteria:

- Mortality > 97%: susceptible *Anopheles* population.
- Mortality 80 – 97%: suspected resistance in the *Anopheles* population.
- Mortality < 80%: resistant *Anopheles* population.

Given the small number of localities where *An. gambiae* was susceptible to deltamethrin, we decided to define R⁺ localities as all localities where *Anopheles* mortality was greater than or equal to 80%. All localities with mortality rates below 80% were considered highly resistant (R⁺⁺⁺) localities.

We did not choose the 80% cutoff at random to separate both areas. This criterion was chosen according to the WHO standard to identify highly resistant mosquitoes [12]. We considered suspected resistant mosquitoes and susceptible ones [12] as lowly resistant.

After susceptibility testing, mosquitoes were kept on silicagel at -20°C for molecular characterization.

Selection of the localities into R⁺ and R⁺⁺⁺ areas

After testing for susceptibility, we randomly selected the sixteen localities for the implementation of our impact study at both defined resistance levels (R⁺ and R⁺⁺⁺) in order to avoid selection bias.

Molecular characterization of *An. gambiae*, PCR species, molecular forms and kdr 1014 F and 1014S

For each locality, 22–49 females *Anopheles* were analyzed by PCR according to the protocol described by Scott *et al.* [13]. Identification of *Anopheles* species was made according to the protocol described by Favia *et al.* [14]. For each locality, DNA extracts from *An. gambiae* allowed us to look at the simultaneous presence of *kdr* mutation 1014 F and 1014S as recommended by Lynd *et al.* [15].

Mapping of the resistance

The geographical coordinates of the localities where larvae were collected from were recorded by GPS and projected onto a map of the region of Plateau. The three levels of susceptibility of *Anopheles* to deltamethrin (0.05%) according to the criteria of the WHO [12] (sensitive, resistant and suspected resistance) were shown on the map. Overall, 56 localities were mapped.

Statistical analysis

The calculation of mortality rates was performed using MS Excel spreadsheet. The chi-square test of comparison of proportions was used to compare mortality rates within localities of the same district and within the two defined areas (R⁺ and R⁺⁺⁺). Knockdown times (KdT50 and KdT95) were determined by logistic regression with probit link. We used the delta-method to determine the 95% Confidence intervals of the KdTs for the two areas. The variation in *kdr* frequency between the two areas, and between both M and S forms of *An. gambiae* was assessed via a logistic regression [16]. The same statistical method was used to assess the spatial variation in resistance levels within districts. The analysis of deviance penalized by the dispersion parameter [17] was used to assess the relevance of the variability.

All analyses were performed with R-2.15.2 statistical software [18].

Results

Deltamethrin-induced mortalities in 56 localities

The *An. gambiae* Kisumu reference strain was susceptible to deltamethrin (0.05%), showing 100% mortality.

Mortality rates obtained after exposing *An. gambiae* wild populations to deltamethrin (0.05%) varied between 20% and 100%.

In Ifangni, mortality rates ranged from 20% in Gblo-gblo and Djègou-djègui to 100% in Zihan. Out of 19 localities, *An. gambiae* was found susceptible only in 2 localities (Zihan and Ko-Aïdjèdo). Suspected resistance was observed in 10 localities (Table 1).

In Sakété, *An. gambiae* was not susceptible. In Iwai, Idi and Djohounkollé suspected resistance was noted (Table 1).

In the district of Pobè, mortality of *An. gambiae* mosquitoes ranged from 45% in Obanigbé to 85% in Agbarou. *An.*

Table 1 Resistance status of *An. gambiae s.l* populations to deltamethrin in the localities of Ifangni and Sakété

Districts	Localities	Total (N)	KdT50 (min)	KdT95 (min)	Dead (N)	Mortality (%)
Ifangni	Lokossa*	44	38.9	74.0	36	82 ^a
	Ko-dogba*	48	36.1	68.6	42	87 ^{ad}
	Zihan*	50	60.0	114.0	50	100
	Baoudjo	89	40.5	77.0	72	81 ^a
	Gbédji	88	100.0	190.0	68	77 ^a
	Igolo	22	111.1	211.1	17	77 ^a
	Araromi*	39	41.6	79.2	33	85 ^{ad}
	Itassouumba*	66	39.2	74.5	59	89 ^{ad}
	Ko-koumolou*	48	32.6	62.0	40	83 ^a
	Itakpako*	131	36.6	69.5	105	80 ^a
	Banigbé Centre	97	42.3	80.3	32	33 ^{bc}
	Tchaada	22	93.8	178.1	7	32 ^{bc}
	Daagbe*	40	31.6	60.0	33	82 ^a
	Akadja	123	38.5	73.1	62	50 ^b
Sakété	Gblo-gblo	45	103.4	196.5	9	20 ^c
	Ko-aïdjèdo*	92	31.2	59.4	90	98 ^d
	Zoungodo*	62	43.5	82.6	52	84 ^a
	Djegoun-djègui	40	75.0	142.5	8	20 ^c
	Ketougbekon*	147	35.7	67.8	121	82 ^b
	Ilakofadji	44	31.6	60.0	30	68 ^a
	Dagbao	45	32.2	61.3	33	73 ^a
	Itadjèbou	34	42.8	81.4	21	62 ^{bc}
	Djohounkollé*	73	39.4	75.0	59	81 ^a
	Igbo-abikou	65	115.4	219.2	25	38 ^b
	Igbola	38	96.7	183.8	19	50 ^{ab}
	Alabansa	30	150.0	285.0	12	40 ^{bc}
	Iwai*	43	37.0	70.3	37	86 ^a
	Ikemon	86	71.4	135.7	40	46 ^{bc}
	Idiagbola	40	52.6	100.0	17	43 ^{bc}
	Yoko Centre	40	31	58.7	30	75 ^a
	Idi*	31	62.5	118.7	30	97 ^d

^{a, b, c, ab, ac, d}The mortality rates with the different superscript in the same district are statistically different ($p < 0.05$).

*The localities with an asterisk are lowly resistant and those without an asterisk are highly resistant.

gambiae proved resistant in all localities except Agbarou where suspected resistance was observed (Table 2).

In Kétou, the lowest mortality rate of *An. gambiae* (67%) was obtained in Alakouta versus 83% in Adjozounmè. Out of a total of 15 localities evaluated, suspected resistance was noted only in Adjozounmè, while full resistance was observed in all other localities (Table 2).

The lowest KdT50 (31 minutes) was obtained in Yoko Centre (district of Sakété) versus 375 minutes in Illékpa (district of Pobè) (Tables 1 and 2).

Overall, across the 56 localities of the four districts, *An. gambiae* was resistant to deltamethrin in 39 localities. However, susceptibility was noted in *An. gambiae* mosquitoes from 2 localities of the district of Ifangni. Resistance of *An. gambiae* to deltamethrin (0.05%) was suspected in 15 localities (Tables 1 and 2).

Table 2 Resistance status of *An. gambiae s.l* populations to deltamethrin in the localities of Pobè and Kétou

Districts	Localities	Total (N)	KdT50 (min)	KdT95 (min)	Dead (N)	Mortality (%)	
Pobè	Igbo-okpa	79	85.7	162.8	58	73 ^{ac}	
	Okeita	101	47.6	90.5	78	77 ^{ac}	
	Obanigbé	40	57.7	109.6	18	45 ^b	
	Agbarou*	55	66.6	126.6	47	85 ^a	
	Issaba	111	100	190	68	61 ^c	
	Okoofi 2	54	96.7	183.8	24	44 ^b	
	Illekpa	39	375	712.5	26	67 ^c	
	Osoumou 2	48	53.6	101.8	34	71 ^c	
	Osoumou 1	70	142.9	271.4	44	63 ^c	
	Onigbolo	90	52.6	100	66	73 ^{ac}	
	Kétou	Alakouta	36	68.2	129.5	24	67 ^{abc}
	Okpometa	57	81.1	154	23	41 ^a	
	Mowodani	52	68.2	129.5	31	60 ^{ab}	
	Idena 2	179	39	74	81	45 ^a	
Kétou	Kpankoun	70	65.2	124	37	53 ^{ab}	
	Okéola	49	66.6	126.6	24	48 ^a	
	Odokoto	95	33.7	64	51	54 ^{ab}	
	Igui-olou	100	49.2	93.4	72	72 ^{bc}	
	Adjozoume*	100	33.3	63.3	83	83 ^c	
	Idena 3	80	68.6	129.5	39	49 ^a	
	Oloumou	94	50.8	96.6	48	51 ^{ab}	
	Kouhoudou	60	47.6	90.5	37	62 ^{ab}	
	Obatedo	95	43.5	82.6	74	78 ^{bc}	
	Atchoubi 1	100	33	62.6	77	77 ^{bc}	
	Atchoubi 2	55	61.2	116.3	35	64 ^{bc}	

^{a, b, c, ab, ac}The mortality rates with the different superscript in the same district are statistically different ($p < 0.05$).

*The localities with an asterisk are lowly resistant and those without an asterisk are highly resistant.

Categorization of localities as R⁺ and R⁺⁺⁺ across the four districts

Overall, out of the 56 localities, 16 were categorized as R⁺ and 40 as R⁺⁺⁺ based on the mortality rates observed (Tables 1 and 2). Out of the 16 R⁺ localities, 11 including the two susceptible ones were located in the district of Ifangni, 3 in Sakété, 1 in Pobè and 1 in Kétou (Tables 1 and 2). Localities classified as R⁺⁺⁺ were distributed as follows: 8 in Ifangni, 9 in Sakété, 9 in Pobè and 14 in Kétou (Tables 1 and 2).

Based on these results, 8 localities (Itakpako, Araromi, Ko-koumolou, Djohounkollé, Ko-Aïdjèdo, Lokossa, Kétougbékon and Iwai) were randomly selected in the R⁺ area and 8 other (Mowodani, Banigbé, Okoofi 2, Ikémón, Akadja, Idéna 2, Igbola and Tchaada) in the R⁺⁺⁺ area for the implementation of our impact assessment study.

Mortality rates were 84% (516/617) in the R⁺ area made of 8 R⁺ localities versus 45% (296/651) for the R⁺⁺⁺ area composed of 8 R⁺⁺⁺ localities ($p < 0.0001$). Statistical analysis also showed that the risk that mosquitoes die in contact with deltamethrin was six times higher in the R⁺ area than in the R⁺⁺⁺ area (OR = 0.15, 95% CI: 0.10-0.23, $p < 0.0001$). In addition, the KdT95 was 67 minutes (95% CI: 52.80-86.21) in R⁺ area versus 93.4 minutes (95% CI: 87.06-113.93) in the R⁺⁺⁺ area ($p < 0.05$).

Molecular characterization of mosquitoes from 16 selected localities (8 R⁺ and 8 R⁺⁺⁺)

Identification of species and forms of *An. gambiae* complex

After testing for susceptibility, Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to identify species of *An. gambiae* s.l.

complex, and the identification of the different forms of each *An. gambiae* s.s species. This characterization was carried out on the collected mosquitoes from the 16 selected localities.

The results show that out of the 506 specimens of *An. gambiae* s.l evaluated in all 16 localities, only *An. gambiae* s.s was found in all localities. Both molecular forms M and S of *An. gambiae* s.s were found in sympatry in all the 16 localities. Overall, 66.8% (338/506) of the mosquitoes belonged to the form M and 32.6% (165/506) to the form S. The proportion related to one or the other form varies depending on the locality (Figure 1). *An. gambiae* s.s form M was predominant in most localities except Lokossa and Ko-Aïdjèdo in Ifangni, Igbola in Sakété and Idéna 2 in Kétou. Both forms were found in similar proportions in Tchaada (12 *An. gambiae* s.s form M out of 22).

Some hybrid individuals M/S (0.6%) were also found in Itakpako (district of Ifangni) and Igbola (district of Sakété).

Detection of the kdr mutation in the molecular forms (M and S) of *An. gambiae* s.s

The 1014S kdr mutation originally from East Africa was absent in 497 mosquitoes tested. However, the 1014 F kdr mutation was detected in the four districts of the region of Plateau. The 1014 F kdr mutation was found in both M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s but at variable frequencies depending on the locality. Indeed, the frequency of the kdr mutation varies between 0.50 and 0.93 in the form M and between 0.45 and 0.92 in the form S (Table 3). The small number of characterized

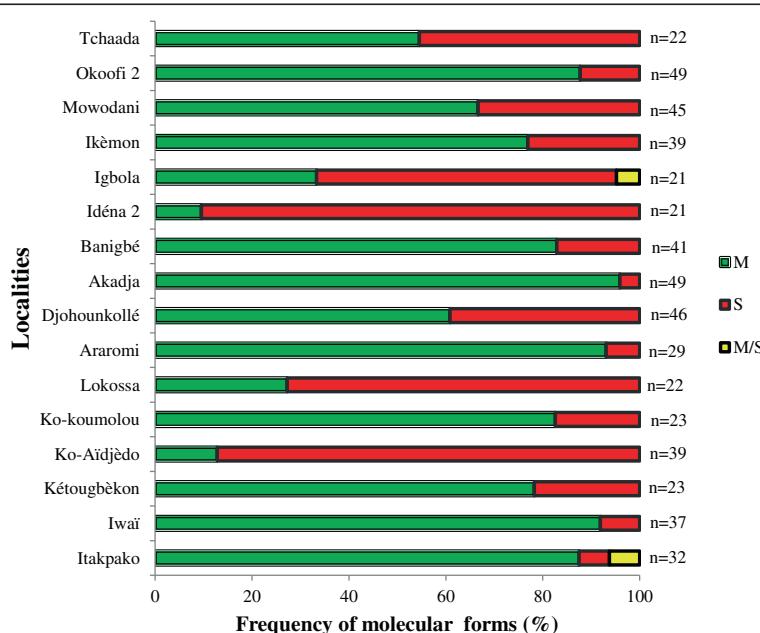


Figure 1 Distribution of *An. gambiae* s.s. molecular forms per locality.

Table 3 Frequencies of 1014 F kdr mutation within *An. gambiae* s.s. molecular forms

Localities/Areas	Molecular forms	N	SS	RS	RR	F (kdr)
<i>R⁺ localities</i>						
Itakpako	M	27	0	17	10	0.69
	S	2	0	2	0	0.50
Araromi	M	24	3	18	3	0.50
	S	2	0	1	1	0.75
Ko-koumolou	M	19	1	16	2	0.53
	S	3	0	3	0	0.50
Djohounkollé	M	26	2	10	14	0.73
	S	17	0	3	14	0.91
Ko-Aïdjedo	M	5	0	4	1	0.60
	S	28	3	16	9	0.61
Lokossa	M	6	0	2	4	0.83
	S	16	0	8	8	0.75
Ketougbekon	M	15	2	6	7	0.67
	S	4	1	3	0	0.38
Iwai	M	30	0	4	26	0.93
	S	3	0	1	2	0.83
<i>R⁺ area</i>	M + S	227	12	114	101	0.70
<i>R⁺⁺⁺ localities</i>						
Mowodani	M	28	0	7	21	0.88
	S	12	1	4	7	0.75
Banigbe	M	28	0	10	18	0.82
	S	5	2	1	2	0.50
Okoofi2	M	43	0	12	31	0.86
	S	6	0	1	5	0.92
Ikemon	M	29	0	7	22	0.88
	S	9	0	4	5	0.78
Akadja	M	46	1	29	16	0.66
	S	2	0	2	0	0.50
Idena2	M	2	0	2	0	0.50
	S	19	2	17	0	0.44
Igbola	M	7	0	6	1	0.57
	S	12	0	8	4	0.66
Tchaada	M	11	0	9	2	0.59
	S	10	0	8	2	0.60
<i>R⁺⁺⁺ area</i>	M + S	269	6	127	136	0.74
Total [(R ⁺ and R ⁺⁺⁺) areas]	M	346	9	159	178	0.74
	S	150	9	82	59	0.67

mosquitoes in some localities did not allow for accurate estimation of the frequency of this mutation. These localities are Tchaada and Lokossa in the district of Ifangni and Igbola in the district of Sakété.

By combining data from the two areas (R⁺ and R⁺⁺⁺), the kdr frequency was similar within both molecular forms: M [F(kdr) = 0.74] and S [F(kdr) = 0.67] with p = 0.17 (Table 3). Furthermore, the aggregated data from the two molecular forms yielded a kdr gene frequency estimated at 0.70 in the R⁺ area versus 0.74 in the R⁺⁺⁺ area. There is no difference between the frequency of the kdr mutation between the two areas (p = 0.13).

Mapping of the resistance of *An. gambiae* to deltamethrin
 Various resistance levels to deltamethrin were observed based on the WHO criteria [12]. Figure 2 illustrates the mapping of the resistance of *An. gambiae* to deltamethrin in the prospected localities. Overall, the map shows the profile of *An. gambiae* resistance to deltamethrin in the region of Plateau in 2011. A concentration of localities where *An. gambiae* was susceptible or suspected resistance to deltamethrin is distinguishable in the district of Ifangni. On the other hand, *An. gambiae* was resistant in most localities in the districts of Sakété, Pobè and Kétou.

Table 4 shows the results of logistic regression analysis that was performed to assess differences in the level of resistance between the districts. In general, although the district of Ifangni was composed of localities where *An. gambiae* was susceptible or suspected resistant, it is clear from this analysis that the level of resistance has not been a significant variation within the four districts [p (LR-test) = 0.22].

Discussion

Our study shows a widespread resistance of *An. gambiae* to deltamethrin in the Plateau region, southeastern Benin. Taking into account the KdTs, the effect of deltamethrin on *An. gambiae* mosquitoes was not uniform across the various localities. Resistance with deltamethrin was associated with relatively high kdr frequencies found in both M and S form of *An. gambiae* s.s.

Out of the 56 localities explored, *An. gambiae* was found susceptible in only two localities (Ko-Aïdjèo and Zihan). These results show a wide distribution of deltamethrin resistance as previously reported by Padonou *et al.* [19] in certain localities of Ouémé, a department near Plateau region. The results also confirm the rapid expansion of pyrethroid resistance in natural populations of *An. gambiae* in Africa [20] and particularly in Benin [21-23]. However, the small numbers of mosquitoes exposed to deltamethrin in some localities did not allow accurate estimations of the mortality rates. This constitutes a major limitation for our study.

Previous studies demonstrated that malaria vector resistance to pyrethroids might be related to an extensive and massive use of LLINs [24,25]. Insecticide molecules at the surface of LLINs might exert a lethal effect on susceptible mosquitoes, therefore selecting for resistant

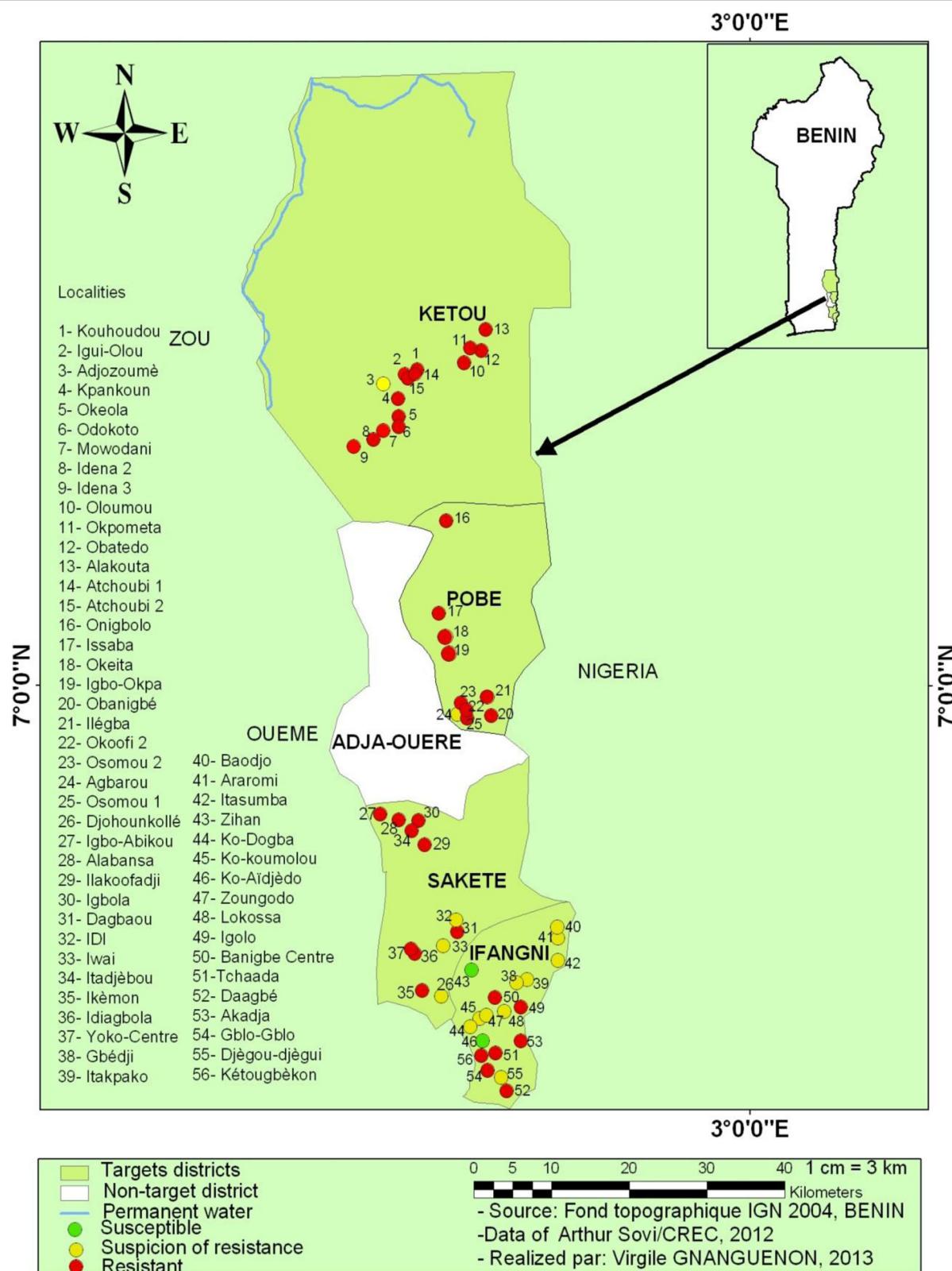


Figure 2 Map showing the distribution of *An. gambiae* resistance to deltamethrin in the Plateau region.

Table 4 Spatial variation of the resistance level of *An. gambiae* to deltamethrin within districts

Districts	Total	Dead (N)	Dead (%)	Coef	OR	95% CI	p (Wald test)	p (LR-test)
Ifangni	1293	936	72.39	0.00	1.00	-	-	0.22
Sakété	569	353	62.04	-0.56	0.57	[0.29-1.14]	0.11	
Pobè	687	463	67.39	-0.24	0.79	[0.41-1.51]	0.47	
Ketou	1222	736	60.23	-0.51	0.60	[0.35-1.04]	0.06	

mosquitoes that reproduce in natural populations. In the department of Ouémé for instance, Padonou *et al.* [19] reported an increase in the resistance of *An. gambiae* to deltamethrin following a mass distribution campaign of LLINs. It is then possible that the resistance level has increased very quickly in the region of Plateau after the selective distribution campaign of LLINs in 2007. Several other factors such as the domestic use of pyrethroids [3] and water run off loaded with insecticide particles from the North of Benin where pyrethroids were massively and uncontrollably used to control cotton pests [26] could also explained the resistance of *An. gambiae* to deltamethrin in the localities of the region of Plateau. The insecticides particles contained in the water could exert a selection pressure on the larvae of *An. gambiae* [27].

Our data surprisingly reveals a low resistance of *An. gambiae* to deltamethrin in the district of Ifangni. Nonetheless, we did not observe any spatial variation in the level of resistance across the four districts ($p = 0.22$). This suggests a similar selection pressure on *An. gambiae* s.l across the four districts. Therefore, other reasons, still unknown to our knowledge, may explain the low levels of resistance of *Anopheles* population to deltamethrin in the district of Ifangni. Further studies must be undertaken to understand the real causes of the low resistance of *An. gambiae* in this district.

PCR analysis reveals that *An. gambiae* s.s was the only species of the *An. gambiae* s.l. complex encountered in all 16 selected localities. The absence of *An. melas* could be explained by the fact that the larvae were all collected from small freshwater pools. This is understandable since *An. melas* larvae are mainly found in brackish water ponds [28]. Similarly, *An. arabiensis* was not present even though it has already been reported in Central Benin [23].

Regarding the molecular forms, the relative dominance of one form over the other could be explained by the presence of specific breeding sites to one or the other molecular forms [29]. Globally, in both areas (R^+ and R^{+++}), 66.8% of the mosquitoes were of M form, 32.6% of S form and 0.6% of the hybrid M/S. This contradicts Yadouléton *et al.* [5] who reported the absence of the form S of *An. gambiae* s.s in the region of Plateau. In fact the presence of the form S in significant proportions in 2011 in that region could be associated to the rainfall pattern

and the rapid infiltration of water into the soil allowing the formation of favorable temporary breeding sites for the development of form S of *An. gambiae* s.s.

Kdr mutation 1014 F has been found in M as well S form of *An. gambiae* s.s, but at variable frequencies depending on the locality. Djènontin *et al.* [30] reported a higher frequency of *kdr* mutation in the form S than in the form M of *An. gambiae* s.s in Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito area between October and December 2007. The same trend has been reported by Diabaté *et al.* [31] and Dabiré *et al.* [32] in the Kou valley in Burkina-Faso and by Dabiré *et al.* [33] in Guinea-Bissau. However, for our study, data from both areas (R^+ and R^{+++}) revealed a similar *kdr* frequency between the two molecular forms ($p = 0.17$). This suggests that the selection pressure exerted on the two molecular forms in the natural environment did not differ significantly across the region.

We did not find the 1014S *kdr* mutation originally from East Africa [34]. However, previous studies have indicated that this mutation was present in Benin [23] and was expanding to the north and center of Benin in *An. gambiae*. It is therefore important to extend the surveillance of *kdr* 1014S in the region of Plateau.

Although a significant difference in mortality rates was found between both areas (R^+ and R^{+++}) ($p < 0.0001$), no difference was observed between the frequencies of *kdr* gene in both areas ($p = 0.13$). In addition, KdT95 was higher in R^{+++} area than in R^+ area ($p < 0.05$). These findings suggest the involvement of other resistance mechanisms in addition to the *kdr* mutation in the mosquitoes from the R^{+++} area.

Recent studies have also reported the involvement of certain metabolic enzymes in the resistance of malaria vectors to pyrethroids in Africa [35] and in several other regions in Benin [36,37]. For example, an overexpression of CYP6M2 and CYP6P3 genes, involved in the metabolism of pyrethroids, has been reported in resistant populations of *An. gambiae* in Porto Novo [36]. Therefore, we believe that the role of metabolic resistance in the region of Plateau deserves further scrutiny.

From the results recorded from the susceptibility tests, we were able to map the distribution of the resistance of *An. gambiae* to deltamethrin. Such a map was necessary since it provides a picture of the availability of localities where *An. gambiae* was still susceptible to deltamethrin.

In addition, this map could be used as an important tool to monitor the dynamics of the resistance of *An. gambiae* to pyrethroids. Moreover, given that our research activities were carried out in collaboration with Benin NMCP, this map should allow Benin NMCP to accordingly adapt its strategy of malaria prevention.

Given the extensive use of LLINs inside houses at this time, it is possible that highly resistant mosquitoes would tend to feed inside more than low resistant *Anopheles* mosquitoes. The deterrence effect of LLINs is likely to be more effective on low resistant *Anopheles* population. If this was verified, the likelihood for highly resistant mosquitoes to transmit malaria parasites would be higher than that of lowly resistant ones. If this assumption was true, it would confirm that vector resistance to insecticides is a major concern to the operational effectiveness of the LLINs distributed in 2011 [38].

Conclusion

The results of this study show a wide distribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau. *An. gambiae* was found susceptible in only two locations in the district Ifangni. Two populations of *An. gambiae* s.s. were encountered in the region: *An. gambiae* s.s form M and *An. gambiae* s.s form S. Both molecular forms were resistant to pyrethroids. Besides the *kdr* mutation, our study suggested the involvement of other resistance mechanisms of *An. gambiae* to pyrethroids in the region of Plateau.

Based on the resistance criteria we defined, more than 70% of the 56 prospected localities were classified as R⁺⁺⁺ localities. This confirms the rapid expansion of the resistance phenomenon across the region. Because of this expansion, we were not able to find the eight susceptibility localities for the implementation of our impact study of the resistance of *An. gambiae* on the effectiveness of LLINs. Instead, we had to define R⁺ and R⁺⁺ areas for the implementation of our study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AS, ID, AM, MA and VC have participated in the design of the study. ID, LS, AS and FT carried out the field activities and the laboratory analyses. VG has contributed to the mapping. AS and MA drafted the manuscript. FOA contributed to the statistical analysis. MO, RA, AA, ID, AM, FT and VC critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to the Bill & Melinda GATES Foundation which supported financially this study. Arthur SOVI obtained financial support for his doctoral training from Ministry of the Higher Education and of Scientific Research.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Benin.

²International Institute of Tropical Agriculture, Calavi, Bénin. ³Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme, Cotonou, Benin. ⁴University of

Massachusetts Amherst, Amherst, USA. ⁵Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin. ⁶Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC, IRD 224-CNRS 5290 UM1-UM2), Montpellier, France. ⁷Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Received: 27 August 2013 Accepted: 21 February 2014

Published: 25 February 2014

References

- Ministère de la Santé du Bénin, Programme National de Lutte contre le Paludisme: *Evaluation par la méthode LQAS de la campagne intégrée d'octobre 2007 de distribution des MILD, de l'Albendazole et de la vitamine A aux enfants de moins de cinq ans et du niveau de quelques indicateurs de suivi de la lutte contre le paludisme*. Cotonou, Benin: PNLP; 2009.
- Elisa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K: *Resistance of Anopheles gambiae s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire*. Ann Soc Belge Med Trop 1993, 73:291–294.
- Akogbéto M, Yacoubou S: *Resistance of Malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets*, Benin, West Africa. Bull Soc Path Exo 1999, 92:123–130.
- Chandre F, Mangnou S, Brengues J, Dossou YJ, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P, Guillet P: *Current distribution of pyrethroid resistance gene (kdr) in Anopheles gambiae complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form*. Parasitologia 1999, 41:319–322.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'Guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Massougbedji A, Akogbéto M: *Insecticide resistance status in Anopheles gambiae in southern Benin*. Malar J 2010, 9:83.
- Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ: *Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in Western Kenya populations of Anopheles gambiae in response to Insecticide-treated bed net trial*. Am J Trop Med Hyg 2004, 70:591–596.
- Etang J, Fonjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C, Nwane P, Chouaibou M, Ndjemai H, Simard F: *Short report: first report of knockdown mutations in the malaria vector Anopheles gambiae from Cameroon*. Am J Trop Med Hyg 2006, 74:795–797.
- Hargreaves K, Koekemoer L, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: *Anopheles funestus resistant to pyrethroid insecticides in South Africa*. Med Vet Entomol 2000, 14:181–189.
- 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, Benin*. Emerg Infect Dis 2007, 13:199–206.
- Institut National de la Statistique Appliquée et de l'Economie: *Recensement général de la population du Bénin*. Cotonou, Benin: INSAE; 2002.
- O'Malley C: *Seven ways to a successful dipping career*. Wing Beats 1995, 6(4):23–24.
- WHO: *Report of the informal consultation. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. Geneva, Switzerland: World Health Organization: Parasitic Diseases and Vector Control (PVC)/Communicable Disease Control, Prevention and Eradication (CPE); 1998.
- Scott J, Brogdon W, Collins F: *Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by PCR*. Am J Trop Med Hyg 1993, 49:520–529.
- Favia G, Della TA, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: *Molecular identification of sympatric chromosomal forms of Anopheles gambiae and futher evidence of their reproductive isolation*. Insect Mol Biol 1997, 6:377–383.
- Lynd A, Ranson H, McCall PJ, Randle NP, Black WC, Walker ED, Donnelly MJ: *A simplified high-throughput method for pyrethroid Knock-down resistance (kdr) detection in Anopheles gambiae*. Malar J 2005, 4:16.
- Dobson AJ: *An Introduction to Generalized Linear Models, Second Edition*. London: Chapman & Hall/CRC; 2001.
- Chambers JM, Hastie TJ: *Linear models. Chapter 4 of Statistical Models in S*. Pacific Grove, California: Wadsworth & Brooks/Cole; 1992.

18. R Development Core Team: *A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011. <http://www.r-project.org>. ISBN ISBN 3-900051-07-.
19. Padonou G, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbó F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbeto M: **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.** *Parasit Vectors* 2012, 5:72.
20. 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(2):91–98.
21. 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.
22. 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, 9:1.
23. Djegbe I, Boussari O, Sidick A, Thibaud M, 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.
24. Protopopoff N, Verhaegen 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.
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. Yadouleton A, Thibaud M, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, Dabiré R, Aïkpon R, Boko M, Glitho I, Akogbeto M: **Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in Anopheles gambiae population in Northern Benin.** *Parasit & Vect* 2011, 4:60.
27. Yadouleton AW, Asidi A, Djouka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbeto MC: **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.
28. Akogbeto M, Romano R: **Infectivité d'Anopheles melas vis-à-vis du Plasmodium falciparum dans le milieu côtier lagunaire du Bénin.** *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1999, 92:57–61.
29. Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, Ose K, Fotsing JM, Sagnon N, Fontenille D, Besansky NJ, Simard F: **Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in Anopheles gambiae.** *BMC Ecol* 2009, 9:16.
30. Djènontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Boussari O, Chabi J, Ossé R, Koudénoukpo S, Corbel V, Akogbeto 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.** *Parasites & Vect* 2010, 3:83.
31. Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguendé TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, Hougard JM: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in Anopheles gambiae s.l. in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67(6):617–622.
32. Dabiré KR, Diabaté A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouédraogo JB, Hougard JM, Chandre F, Baldet T: **Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae in a rice growing area in South-Western Burkina Faso.** *Malar J* 2008, 7:188.
33. Dabiré KR, Diabaté A, Agostinho F, Alves F, Manga L, Faye O, Baldet T: **Distribution of the members of Anopheles gambiae and pyrethroid knock-down resistance gene (kdr) in Guinea-Bissau, West Africa.** *Bull Soc Pathol Exot* 2008b, 2(101):119–123.
34. 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.
35. Müller P, Chouaibou M, Pignatelli P, Etang J, Walker ED, Donnelly MJ, Simard F, Ranson H: **Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in Anopheles arabiensis sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon.** *Mol Ecol* 2008, 17:1145–1155.
36. Djouka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of Anopheles gambiae s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, 9:538.
37. Djouka R, Irving H, Tukur Z, Wondji SC: **Exploring Mechanisms of Multiple Insecticide Resistance in a Population of the Malaria Vector Anopheles funestus in Benin.** *Plos one* 2011, 6:e27760.
38. Tokponnon FT, Aholoukpe B, Denon EY, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Gazard D, Akogbeto MC: **Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin.** *Parasites & Vectors* 2013, 6:265.

doi:10.1186/1471-2334-14-103

Cite this article as: Sovi et al.: Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). *BMC Infectious Diseases* 2014 14:103.

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



RESEARCH**Open Access**

Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin

Filémon T Tokponnon^{1,2,3,4*}, Bruno Aholoukpe^{1,2}, Eric Y Denon^{1,2}, Virgile Gnanguenon^{2,3,4}, Alexis Bokossa², Raphael N'guessan⁵, Mariam Oke^{1,2}, Dorothée Kinde Gazard² and Martin C Akogbeto^{2,3,4}

Abstract

Background: In Benin, around four million Long-Lasting Insecticide-treated Nets were freely distributed to household to prevent malaria in 2011. In contrast to a previous campaign that targeted only children under 5 years and pregnant women, this distribution campaign was conducted in order to achieve universal coverage. This study presents the results of LLIN coverage and utilization after the distribution campaign.

Methods: The study was a cross-sectional household survey which utilized a stratified two-stage cluster sampling design. The strata represented the twelve departments covered by the national distribution campaign in 2011 and included a total of 4,800 households randomly selected in the country. A questionnaire adapted from the standard Malaria Indicator Survey (MIS) Household Questionnaire was used. Data were entered using QPS software and analyzed with R 2.14.1.

Results: LLIN ownership was 86.4% (74 – 94). On average, each household received 3 LLINs (2–4). The proportion of households that met the ratio one net for two persons was 77%.

The proportions of individuals sleeping under LLINs were high (84.8%). LLIN use among urban residents was 10% lower than in effective users from rural areas ($P = 0.00224$).

Conclusions: The universal distribution campaign conducted in Benin has increased LLIN ownership and use in the community. But additional efforts are needed to improve and maintain LLIN coverage.

Keywords: Long-lasting insecticide-treated nets, Universal coverage, Malaria, Benin

Background

The scaling-up of LLINs interventions to achieve high coverage of most or ultimately all at-risk populations has become the national malaria control standard in the Africa region with substantial support from the Global Fund and the Roll Back Malaria (RBM) Partnership [1]. Insecticide-treated nets (ITNs) remain effective tools for malaria prevention and can significantly reduce severe disease and mortality due to malaria, especially among the most vulnerable populations [2]. In recent decades, resources to fight malaria have increased and many countries across sub-Saharan Africa are rapidly expanding LLIN ownership

coverage through several strategies including, social marketing [3,4] and free distribution to target groups (through antenatal care or immunization campaigns) [5–9]. Actually, promotion of LLIN use has shifted in emphasis from a focus on target groups to a broader objective of universal coverage. To achieve universal coverage, the RBM Partnership aim to distribute one LLIN for every two people by 2015 [1]. The main goal of this mass distribution is to protect all people living in endemic areas [10].

In 2007, the first campaign of mass distribution of LLINs took place in Benin. The targets were children under 5 years and pregnant women. Since 2008, Benin has adopted a strategy of routine distribution of LLINs to children <1 year old through measles vaccination sessions and pregnant women through antenatal clinics. In order to achieve universal coverage, the National Malaria

* Correspondence: filemont@yahoo.fr

¹National Malaria Control Program, Cotonou, Benin

²Ministry of Health, Cotonou, Benin

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

Control Programme (NMCP) distributed 4 674 799 new LLINs mainly Olyset Nets[®] from Summitomo, PermaNet 2.0[®] from Vestergaard-Frandsen, and Interceptor[®] from BASF, all free of charge and accessed through a campaign in 2011. The new National Strategic Plan to control malaria will repeat this intervention every three years to maintain universal coverage for sustained impact against malaria. Several partners are involved in the implementation of this intervention, including the Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria (GFATM), the World Bank, the USA President's Malaria Initiative (PMI) and Projet d'Appui au Développement du Système Sanitaire (PADS)/WHO. To supplement LLINs, yearly rounds of Indoor Residual Spraying (IRS) based on bendiocarb (FICAM[®] WP, BAYER,) were done on a regional basis.

The urgent need for data to inform policy about the level of achievement of the universal coverage led to the decision to conduct a rapid assessment of the first campaign for universal access. In this we aimed to determine the proportions of households that received free distribution of LLINs during the campaign and estimate households' coverage rate at the national and regional level after the campaign. We also evaluated the proportions of children under five and pregnant women using LLINs.

Methods

Study area

The study was conducted in Benin (West Africa) and involved 12 districts

- Alibori, Borgou, Atacora and Donga from the North of the country
- Collines, Zou in the center;

Couffo, Plateau, Mono, Atlantique, Oueme and Littoral located in the southern part (Figure 1). The northern area is characterized by a Sudanian semi-arid bioclimatic zone with only one rainy season in the year (June to October) and a mean annual rainfall below 900 mm. It is characterized by a dry savanna.

The center part is characterized by an intermediate bioclimatic zone (tropical Sudano-Guinean climate) with humid savanna and an average rainfall reaching 1000 mm per year.

The southern area, near the Atlantic coast, is characterized by a Guinean-bioclimatic zone with two rainy seasons (April–July and September–November) and an average annual rainfall of >1500 mm with degraded tropical forest.

Study population

The study was a cross-sectional household survey which utilized a stratified two-stage cluster sampling design. The strata represented the twelve departments covered by the

national distribution campaign in 2011. Each district represented a survey domain. The first stage was the selection of the clusters. In each district, an alphabetical list of villages and grouping of populations sizes by village and city were established. A total of 40 clusters were selected per district. Within each cluster, 10 households were randomly selected, resulting in a total sample of 4,800 households in the country. To form clusters, population data was obtained from the third General Population and Housing Census conducted in Benin in 2002.

The second stage involved the selection of households. In the cluster, the first household to investigate was randomly selected from the household registration lists of the distribution campaigns. The first household found in this list was the gateway to the cluster. In urban areas with more houses, the selection of the next households were done after every 10 households count while in rural areas a reduced jump space of 5 households was left between two consecutive households selected.

Recruitment and training of interviewers

Interviewers were recruited by district on advice and recommendation by regional health officers. Four interviewers and one supervisor were recruited per district. Interviewers were nurses, midwives, social health workers and anthropologists, while supervisors were senior consultants. In order to avoid information bias, interviewers were deployed in a department other than the one they originate from. Before the collection of information in selected clusters, a training session was organized by interviewing 60 households from 12 villages located in districts near Cotonou, the capital city of Benin, not included in the study. Adjustment was made after the training of the field team.

Data collection

Data collection was conducted from November 28th to December 5th, 2011, corresponding to four months after the distribution campaign. A questionnaire adapted from the standard Malaria Indicator Survey (MIS) Household Questionnaire [11] was used. The questionnaire was divided into sections including household roster, household characteristics, the campaign of net distribution, nets received during the campaign, nets owned by the household and their use.

In each district, the data were collected by two teams. Each team was composed of two interviewers and a supervisor. In each cluster, interviewers were aided in their task by a guide identified locally in collaboration with the head of the village or the officer of the health center. Each team covered an average of 2–4 clusters per day depending on the location.

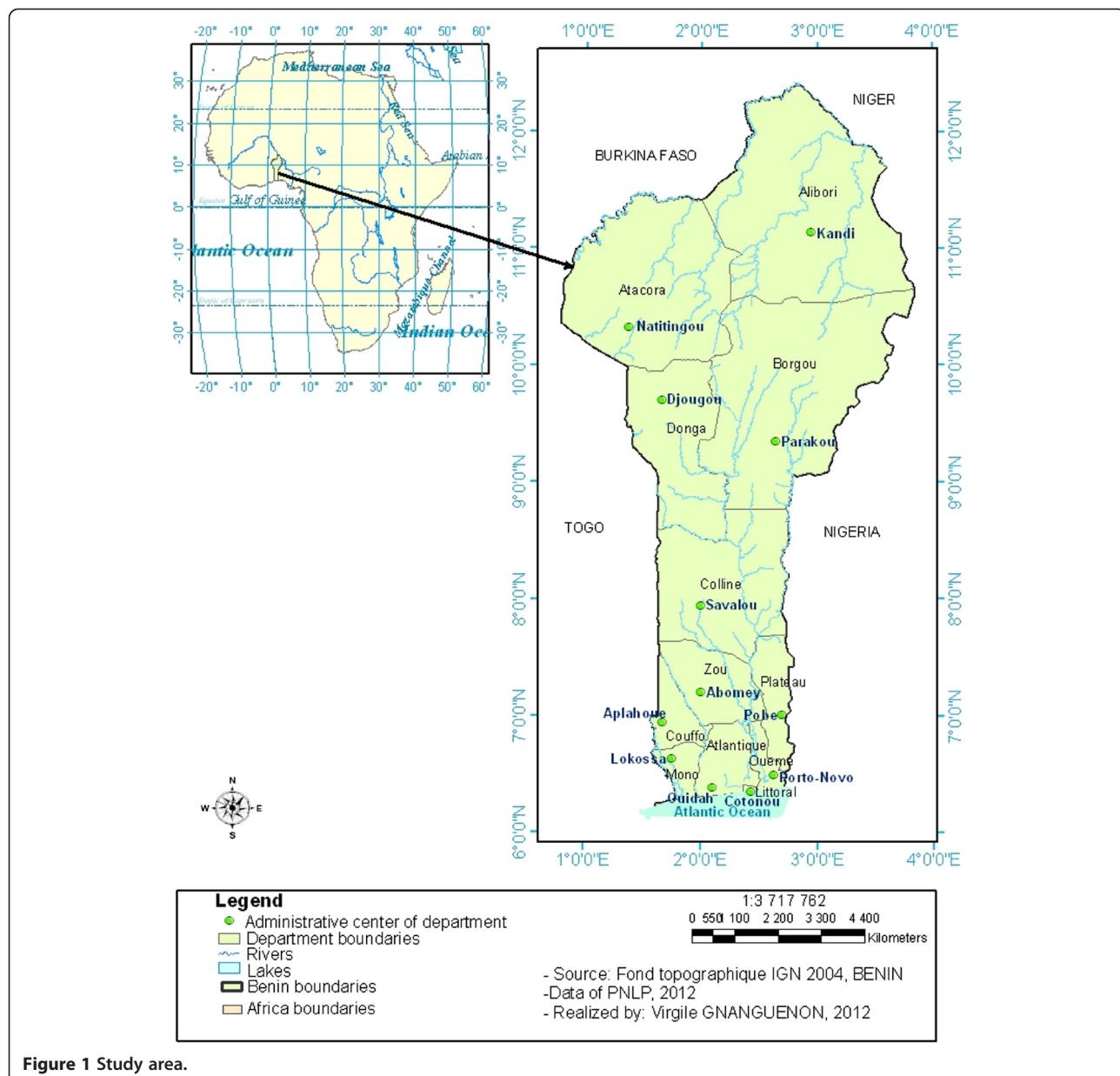


Figure 1 Study area.

Each selected household was visited. The head of household or an adult person acting on behalf of the head was interviewed. In occasions where no appropriate respondent was found in a particular household, the visit of the next home was scheduled. The techniques used for the data collection are structured interviews and direct observation after obtaining the consent of the head of household. A quality control check validating the data collected was made by each supervisor. A summary report form on the quality of the data collected was developed. It aims to check for the compliance with the household recruitment methodology and the completeness of the survey forms.

Data processing and analysis

Data entry was done using QPS software with double entry of all records. Both data sets were then compared and any discrepancy in records was verified using the original questionnaires.

After the first stage of cleaning, the data set was transferred to R 2.14.1 for analysis.

Indicators

Net coverage: the proportion of households with at least one LLIN and the average number of LLIN per household.

Ratio one net for two person (Intra-household coverage): the proportion of household with at least one LLIN for two people.

Net usage: proportion of residents who slept under LLIN the previous night.

The association between LLIN ownership, usage and explanatory variables (E.g. Size of households, gender, pregnancy status, etc.) were assessed using a logistic regression.

Ethical clearance

This paper used data from net free distribution campaign survey conducted on behalf of the National Malaria Control Programm in Benin. Because this was part of the programmatic activity, ethical clearance was exempted. Informed consent was obtained from each participant.

Results

Sample characteristics

A total of 4800 households participated in the survey (Table 1). Of these, 2991 representing 62% lived in rural areas and 1809 (38%) in urban areas. Among the heads of households interviewed, 2173 (45%) were female and 2627 (55%) were male. In the rural areas 41% of the heads of households were female and 59% were male whereas in the urban areas 53% of the heads were female and 47% were male. The average household size was 6 people (Table 1). Children under the age of five were recorded in 66% (3182) of the households and the average number of children under five per household was 1. Pregnant women were recorded in 14% (652) of the households (Table 1).

ITNs coverage and ownership after the distribution campaign in July 2011

Of the 4800 households surveyed, 4672 (97.3%) were informed of the distribution campaign. LLINs distribution vouchers had been given to 4290 (89.4%) households and 4147 (96.7%) of them actually received LLINs from the campaign (Table 2). LLINs universal coverage targeted by the distribution campaign was not met in any department. The percentage of households that met the universal coverage rate is lower in Littoral (52.5%) and Oueme (73%) and higher in Collines and Borgou (86%). The proportion of individuals sleeping under LLINs was 84.8%, above the threshold of massive usage. The distribution campaign increased the LLIN coverage (proportion of households with at least one LLIN) and usage (Table 2). The universal coverage was not reached in all the households but the LLINs use by people was above the threshold (80%) leading to a collective protecting effect (mass protection effect).

Factors associated with LLINs ownership

In the urban areas, 1456 (80.49%) households out of a total 1809 households had at least one LLIN. In the rural areas, 2691 households representing 89.97% of the households had at least one LLIN (Table 3). The area of residence, i.e. urban residents had 54% lower opportunity to own an LLIN than those living in rural areas (OR = 0.46 [0.39-0.54]; p < 0.001) (Table 3).

Crowding within households played a significant role in ownership of LLINs. The odds of securing an LLIN at home during the campaign increased steadily with family members found within households. Relative to households with a single occupant, it significantly increased to 1.52 [1.03-2.23] (P = 0.034) within households with 2-4

Table 1 Baseline characteristics of households

	Number of households	Average size of households	Average households with at least one child < 5	Average children under 5 per households	% households with at least one pregnant woman
Atacora	400	6 [5.89-6.72]	65 [63.86-66.14]	1 [0.95-1.15]	10 [09.03- 11.04]
Donga	400	7 [6.91-7.42]	72 [70.83-72.67]	1 [1.27-1.53]	13 [12.02-14.04]
Alibori	400	5 [5.09-6.36]	63 [62.06-64.44]	1 [0.94-1.13]	14 [13.02- 15.03]
Borgou	400	10 [8.95-12.68]	67 [66.19-68.31]	2 [1.62-2.10]	19 [18.02- 20.02]
Collines	400	6 [6.04-7.29]	74 [73.16-74.85]	1[1.11-1.31]	17 [16.03-18.00]
Zou	400	5 [5.17-6.97]	60 [58.0-61.30]	1 [0.82-1.00]	12 [11.04-13.02]
Mono	400	6 [5.46-6.60]	63 [61.54-63.96]	1 [0.90-1.09]	14 [13.03-15.02]
Couffo	400	9 [8.17-10.92]	72 [70.83-72.67]	2 [1.40-2.71]	18 [17.03-19.01]
Ouémé	400	5 [5.12-6.17]	64 [63.09-65.41]	1 [0.95-1.53]	13 [12.02-14.03]
Plateau	400	6 [5.63-7.32]	62 [60.25-62.75]	1 [0.92-1.13]	10 [09.04-11.03]
Atlantique	400	7[6.50-7.89]	72 [71.09-72.91]	1 [0.88-1.38]	15 [14.03-16.01]
Littoral	400	5 [5.06-6.11]	62 [60.77-63.24]	1 [0.82-1.00]	11 [10.01- 12.05]
Mean average	400	6.42 [6.04-6.78]	66.33 [65.99-66.67]	1.16 [0.94-1.39]	13.83 [13.37-14.28]

Table 2 LLINs coverage and ownership per household

Department	% of households informed about the distribution	% of households that received a coupon	% of household that received LLIN	Average LLIN received per household	Proportion of households that met the ratio one net for two persons
Atacora	97.0 [94.83-98.28]	95.7 [93.30-97.33]	93.8 [90.94-95.73]	2.98	75.3 [71.02-79.47]
Donga	97.0 [94.83-98.28]	96.7 [94.52-98.09]	94.8 [92.11-96.54]	3.26	83.3 [79.60-86.90]
Alibori	99.0 [97.46-99.61]	91.3 [88.07-93.64]	89.3 [85.83-91.92]	2.36	75.5 [71.28-79.71]
Borgou	99.5 [98.20-99.86]	93.2 [90.36-95.32]	89.5 [86.11-92.14]	3.95	86.0 [82.59-89.40]
Collines	98.3 [96.43-99.15]	92.2 [89.21-94.49]	92.3 [89.21-94.49]	2.94	86.3 [82.87-89.62]
Zou	98.7 [97.46-99.61]	89.2 [85.83-91.92]	86.3 [82.53-89.28]	2.34	77.5 [73.40-81.59]
Mono	91.5 [97.46-99.61]	84.2 [80.36-87.49]	79.3 [75.01-82.94]	2.27	78.0 [73.94-82.05]
Couffo	96.0 [88.36-93.61]	89.0 [85.55-91.70]	88.5 [85.00-91.27]	3.36	79.3 [75.27-83.22]
Oueme	96.7 [94.52-98.09]	80.3 [76.07-83.86]	76.8 [72.37-80.62]	1.98	73.0 [68.64-77.35]
Plateau	98.0 [96.10-98.98]	87.3 [83.62-90.17]	85.5 [81.71-88.61]	2.70	79.8 [75.81-83.68]
Atlantique	99.2 [97.82-99.74]	91.5 [90.36-95.32]	87.0 [83.35-89.95]	2.78	80.8 [76.88-84.61]
Littoral	97.0 [94.83-98.28]	81.7 [77.67-85.23]	74.0 [69.49-78.06]	2.00	52.5 [47.60-57.39]
Mean	97.3 [96.84-97.75]	89.4 [88.47-90.2]	86.4 [85.40-87.34]	2.74	77.3 [76.06-78.43]

members, 1.78 [1.2-2.63] ($P = 0.004$) in those with 5–7 members and to 2.66 [1.75-4.06] ($P < 0.001$) in households sharing 8 members and above.

There was no association between ownership of LLINs and the status of being pregnant at a district ($OR = 1.13$ [0.87-1.48]; $P = 0.728$). By contrast, both the head of household gender status of being a male and the fact of having a child <5 yrs old within households significantly increased

the chance of owning an LLIN ($OR = 1.53$ [1.27-1.83]; $P < 0.001$ for gender) and ($OR = 1.39$ [1.14-1.7]; $P = 0.001$ for age) (Table 3).

LLINs actual use rate and associated factors

The proportions of individuals sleeping under LLINs the night before they were interviewed was high (84.8%). The odds of effective use of LLINs among urban residents was

Table 3 Logistic regression assessing factors associated with LLIN ownership

Factors	Number of individuals	Number of individual using LLIN (%)	Odds ratios (95% CI)	P
Total number of individuals	27794	23575(84.82)		
Place of residence				
Rural	9458	15640(85.30)	1	
Urban	18336	7935(83.90)	0.90 [00.84-00.96]	0.00224
Size of the household				
0-1 member	145	131(90.34)	1	
2-4 members	3915	3490(89.14)	0.97 [00.53-01.64]	0.91232
5-7 members	8876	7692(86.66)	0.89 [00.49-01.50]	0.68577
8 and more members	14858	12262(82.53)	0.80 [00.44-01.35]	0.43840
Age				
15-25 years	2523	2143(84.94)	1	
26-35 years	7207	6385(88.59)	1.50 [01.31-01.72]	< 0.001
36-45 years	7741	6721(86.82)	1.34 [01.17-01.53]	< 0.001
46 and more years	10323	8326(80.65)	0.91 [00.80-01.03]	0.12776
Ratio 1 net for 2 person met				
No	13174	10333(78.43)	1	
Yes	14620	13242(90.57)	2.47 [02.30-02.65]	< 0.001
Gender				
Female	10161	8630(84.76)	1	
Male	17633	14945(84.93)	1.10 [01.03-01.19]	0.855

10% lower than in effective users from rural areas (OR = 0.90 [00.84-00.96]; P = 0.00224).

The actual usage rates of LLINs among family members were similar across districts, regardless of whether members were crowded or not within households (OR = 0.80-0.97; p = 0.43-0.91) (Table 4). Middle age class (25–46 yrs old) had improved attitude of sleeping under LLINs compared to younger classes between 15–25 yrs old ($P < 0.0001$) but such acknowledgeable attitude was not observed among classes older than 46 yrs and above ($P = 0.12776$) (Table 4).

In areas where the recommended ratio of 1 LLIN per every 2 persons was met, the odds of effective use increased 2.4-fold [02.30-02.65] ($P < 0.001$) compared to areas where this statement was not met.

We observed no influence of the gender status of the head of household in the rate at which LLINs was effectively used; the odds of usage being similar whether the household was headed by a man or woman (OR = 1.10 [01.03-01.19]; P = 0.855).

Discussion

The study revealed that 86.4% of households surveyed have at least one LLIN and confirmed the results observed in the Demographic Health survey conducted in 2012 in Benin [12]. In another study conducted in Benin in 2010 [13] before the distribution campaign, 40% of households have at least one LLIN. These observations

showed that the national distribution campaign of LLINs conducted in Benin in July 2011 has significantly increased LLINs coverage. Universal coverage at country level as defined by World Health Organization [14] is then reached. The results also confirmed the evolution of performance indicators to the strategic objectives of the sub-regions and those of the NMCP/Benin, which aimed by this free distribution campaign to bring the proportion of households with at least one LLIN from 58 to 90% by the end of 2011 [15]. Although the campaign increased household LLIN ownership, it failed to attain its goal to bring the proportion of 90% of household with at least one LLIN because the average LLIN coverage observed in this study was 86.4%. In addition, the universal bed net coverage goal defined as one for every 2 people was not also achieved. Only 77% of the households surveyed met this cut-off suggesting that the number of LLIN distributed may not be sufficient to protect and cover 23% of the Beninese households that received at least one LLIN. But, there were important variations with this indicator between departments; the proportion of households in a department that have enough nets for every two persons ranged from 52% to 86% suggesting that households that did not have enough nets ranged from 14% to 48%. In fact, the maximum number of LLINs to households in the national distribution campaign was eight per household and this may affect ownership in large households size [15]. This

Table 4 Logistic regression assessing factors associated with LLIN use

Factors	Number of individuals	Number of individual using LLIN (%)	Odds ratios (95% CI)	P
Total number of individuals	27794	23575(84.82)		
Place of residence				
Rural	9458	15640(85.30)	1	
Urban	18336	7935(83.90)	0.90 [00.84-00.96]	0.00224
Size of the household				
0-1 member	145	131(90.34)	1	
2-4 members	3915	3490(89.14)	0.97 [00.53-01.64]	0.91232
5-7 members	8876	7692(86.66)	0.89 [00.49-01.50]	0.68577
8 and more members	14858	12262(82.53)	0.80 [00.44-01.35]	0.43840
Age				
15-25 years	2523	2143(84.94)	1	
26-35 years	7207	6385(88.59)	1.50 [01.31-01.72]	< 0.001
36-45 years	7741	6721(86.82)	1.34 [01.17-01.53]	< 0.001
46 and more years	10323	8326(80.65)	0.91 [00.80-01.03]	0.12776
Ratio 1 net for 2 person met				
No	13174	10333(78.43)	1	
Yes	14620	13242(90.57)	2.47 [02.30-02.65]	< 0.001
Gender				
Female	10161	8630(84.76)	1	
Male	17633	14945(84.93)	1.10 [01.03-01.19]	0.855

result was observed in north-west Tanzania after national distribution campaign [16]. The same result (40%) was also reported after national distribution campaign at Senegal in 2010 [17].

The proportion of households that received a coupon was 89% for the whole country and the proportion of household that received at least one LLIN was 86%. This observation showed that the distribution procedure was efficient but could be improved. However, the relationship between distributed coupons and receiving LLINs remains to be explored in several localities [18]. Some households, for reasons of unavailability or difficulties in finding the location of the distribution, or late removal sites distribution and also the long waiting times, have not received LLINs. This state of affairs could justify the low coverage observed in the departments of Littoral and Oueme.

In urban areas, the number of households with at least one LLIN was also lower than in rural areas. This could be associated with the fact that many people in urban areas have not time to go to the distribution point or have not received a coupon. In rural areas of Benin, people are often available and can easily go to the distribution point to receive LLIN. These reasons could explain why the place of residence plays a key role in LLIN ownership. The size of household is also associated with LLIN ownership and is adequacy with the objectives of the distribution campaign which aimed to provide LLIN according to household size. The presence of a pregnant woman did not play a role in LLIN ownership. This observation could be explained by the few number of pregnant women recorded per household in this study. The presence of children under five in the household was significantly bound with LLIN ownership. This result may be due to the presence of an average of one child under five per household. The odd of male head of households with at least one LLIN was significantly higher than that of female. This is due to the high number of male heads of household in Benin. Before the distribution campaign of 2011, to be a pregnant woman was an important factor in LLIN ownership [15]. Currently, this trend is being reversed in Benin by the distribution in universal access; but to be a child under five seems to still play a key role in LLIN ownership.

Around 84% of households' members slept under LLIN the night before, suggesting that the distribution campaign increased bed net usage. But the number of individuals who slept under LLIN in urban areas is lower than in rural areas. This shows a low use of LLIN in urban areas and could be explained by hot weather associated with low mosquito nuisance which did not motivate LLIN use. According to Pulford *et al.* [19], low mosquito density is the most widely identified reason for LLIN non-use. However, more investigation to determine factors associated with low LLIN use in urban areas is important to induce

behaviour change in urban areas. This study showed that household size does not play a role in LLIN use. LLIN use was similar among family members [20] showing that the 2011 distribution campaign successfully achieved the goal of universal access to LLIN. All groups of people at risk to malaria infection are covered but the middle age class (25–46 yrs old) had an improved attitude of sleeping under LLINs. This finding was also observed by Garley *et al.* [21] in Nigeria who showed that people over 25 years old use more LLIN. This difference in LLIN use between this age group and others could be due to sleeping arrangements. People of this class of age are often married and sleep together with their spouse; this could increase the number of people of this class of age that use LLIN comparatively to other class of age.

The universal coverage aimed to cover all people in the community but not only the target groups. The goal is to provide equitable protection to all household members and to benefit of the collective protecting effect induced by the high household coverage. The comparison of LLIN usage between family members illustrated the increased conscientiousness in LLIN use in Beninese population. Then, with more efforts and engagements from different partners implicated in malaria control strategies in Benin, all the goals of universal coverage will be achieved.

This study showed positive impact of mosquito net distribution campaign in Benin. However, further assessment would have been possible, if logistics and baseline data for households' economic characteristic and net use were available. The analysis of net coverage and net use was restricted to the post campaign survey and reference before the campaign was also limited to PNLP (2011) [13]. Therefore, it was important to conduct an assessment before each distribution campaign to provide reference data for the post-campaign assessment.

Conclusion

This study shows an improvement of the performance indicators towards universal coverage. But it should be clarified that further efforts are still required to achieve the standard of an ITN for two people in the household. Efforts are also required in order to maintain the observed coverage rates in different department safer this campaign that help to cover around nine out of ten households.

This assessment allows us to have the data that could help the national malaria control program to improve others LLIN campaigns to reduce morbidity and mortality due to malaria in Benin.

Competing interests

There are neither any financial competing interests nor any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript.

Authors' contributions

FTT collected analyzed, interpreted data and wrote the manuscript. BA EYD and AB were responsible for field collection; Data analyze and helped in drafting the manuscript. VG contributed to the mapping, helped in drafting the manuscript and revised the manuscript. RN interpreted data and revised the manuscript. MO, DKF and MCA conceived and designed the study, supervised field's procedures, and review the manuscripts. All authors have read and approved the manuscript.

Acknowledgements

This work received a financial support from Global Fund, World Bank, USAID through the President's Malaria Initiative and Projet d'Appui au Développement du Système Sanitaire (PADS)/WHO. The authors express their sincere thanks to the fieldworkers and all those who participated in the study. The authors would also like to thank the PNLP, WHO, Africare-Benin. A special thanks to, Dina Gbenou, Evelyne Chaffa Alyko, Denakpo Boniface, Fassinou Hector, Akakpo Evelyne, Pio Abou Bakary, Akogbeto Petas, Hounnankan Atanase, Ossè Razaki and Oke-Agbo Frédéric for their participation.

Author details

¹National Malaria Control Program, Cotonou, Benin. ²Ministry of Health, Cotonou, Benin. ³Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ⁴Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ⁵London School of Hygiene and Tropical Medicine, Kepel Street, London, UK.

Received: 17 July 2013 Accepted: 10 September 2013

Published: 16 September 2013

References

1. Roll Back Malaria: 2001–2010: Decade to roll back malaria in developing countries, particularly in Africa (A/64/302) | ReliefWeb. Geneva: World Health Organization; 2008.
2. Lengeler C: Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, 2:CD000363.
3. Noor AM, Amin AA, Akhwale WS, Snow RW: Increasing coverage and decreasing inequity in insecticide-treated bed net use among rural Kenyan children. *PLoS Med* 2007, 4:e255.
4. Grabowsky M, Nobiya T, Selanikio J: Sustained high coverage of insecticide-treated bednets through combined catch-up and keep-up strategies. *Trop Med Int Health* 2007, 12:815–822.
5. Beer N, Ali AS, De Savigny D, Al-mafazy AH, Ramsan M, Abass AK, Omari RS, Björkman A, Källander K: System effectiveness of a targeted free mass distribution of long lasting insecticidal nets in Zanzibar Tanzania. *Malar J* 2010, 9:173.
6. Blackburn BG, Eigege A, Gotau H, Gerlong G, Miri E, Hawley WA, Mathieu E, Richards F: Successful integration of insecticide-treated bed net distribution with mass drug administration in Central Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 75:650–655.
7. Gerstl S, Dunkley S, Mukhtar A, Maes P, De Smet M, Baker S, Maikere J: Long-lasting insecticide-treated net usage in eastern Sierra Leone - the success of free distribution. *Trop Med Int Health* 2010, 15:480–488.
8. Grabowsky M, Farrell N, Hawley W, Chimumbwa J, Hoyer S, Wolkon A, Selanikio J: Integrating insecticide-treated bednets into a measles vaccination campaign achieves high, rapid and equitable coverage with direct and voucher-based methods. *Trop Med Int Health* 2005, 10:1151–1160.
9. Wolkon A, Vanden Eng JL, Morgah K, Eliades MJ, Thwing J, Terlouw DJ, Takpa V, Dare A, Sodahlon YK, Doumanou Y, Hightower AW, Lama M, Thawani N, Slutsker L, Hawley WA: Rapid scale-up of long-lasting insecticide-treated bed nets through integration into the national immunization program during child health week in Togo, 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2010, 83:1014–1019.
10. Teklehaimanot A, Sachs JD, Curtis C: Malaria control needs mass distribution of insecticidal bednets. *Lancet* 2007, 369:2143–2146.
11. Roll Back Malaria: World Malaria report. Geneva: World Health Organization; 2005.
12. Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique (INSAE), ICF International: Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples du Bénin EDS-MICS-IV 2011–2012. Cotonou: Ministère du Développement et de l'économie; 2012:19–20.
13. PNLP-AFRICARE BENIN-CRS BENIN: Evaluation finale du projet d'appui à la lutte contre le paludisme. Cotonou: Ministère de la Santé; 2011:42.
14. WHO: Report of the twelfth WHOPES working group meeting. Geneva: World Health Organization; 2008:127.
15. PNLP: Campagne de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action aux ménages du Bénin. Cotonou: Ministère de la Santé; 2012:11.
16. West PA, Protopopoff N, Rowland MW, Kirby MJ, Oxborough RM, Mosha FW, Malima R, Kleinschmidt I: Evaluation of a national universal coverage campaign of long-lasting insecticidal nets in a rural district in north-west Tanzania. *Malaria J* 2012, 11:273.
17. Julie T, Robert P, Salif N: Evaluation de la campagne intégrée de distribution de MiILD, de vitamine A et de Mébendazole au Sénégal. Dakar: Ministère de la santé; 2011:93.
18. PNLP: Evaluation Post Campagne De La Distribution Gratuite De Miild En 2011 Au Benin. Cotonou: Ministère de la Santé; 2011:58.
19. Fulford J, Hetzel MW, Bryant M, Siba PM, Mueller I: Reported reasons for not using a mosquito net when one is available: a review of the published literature. *Malaria J* 2011, 10:83.
20. Ye Y, Patton E, Kilian A, Dovey S, Eckert E: Can universal insecticide-treated net campaigns achieve equity in coverage and use? The case of northern Nigeria. *Malaria J* 2012, 11:32.
21. Garley AE, Ivanovich E, Eckert E, Negroustoueva S, Ye Y: Gender differences in the use of insecticide-treated nets after a universal free distribution campaign in Kano State, Nigeria: post-campaign survey results. *Malaria J* 2013, 12:119.

doi:10.1186/1756-3305-6-265

Cite this article as: Tokponnon et al.: Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. *Parasites & Vectors* 2013 6:265.

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

Assessment of long-lasting insecticidal net coverage, use and physical integrity one year after universal distribution campaign in Plateau department in South-East Benin

Filémon T. Tokponnon^{1, 2,,5,6*}, Yolande Sissinto³, Aurore Hounto Ogouyémi³, Arthur Sovi^{5,6}, Virgile Gnanguenon^{5,6}, Adicath Adéola Adéothy³, Abel Wapo³, Bruno Aholoukpe^{1,2}, Patrick Makoutodé³, Alioun Adéchoubou¹, Ossè Razaki^{5,6}, Raphael N'guessan⁷, Dina Gbénou⁴, Mariam Oke^{1,2}, Dorothée Kinde Gazard², Achille Massougbedji³ and Martin C. Akogbéto⁵

¹National Malaria Control Program, Cotonou, Benin.

²Ministry of Health, Benin.

³Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey Calavi, Benin.

⁴World Health Organisation, Benin.

⁵Faculte des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin.

⁶Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin.

⁷London School of Hygiene and Tropical Medicine, Kepel Street, London, UK.

Accepted 20 January, 2014

Long-lasting insecticidal nets (LLINs) have proved to be an important tool for the malaria control and other vector-borne diseases. Benin, by its National Malaria Control Program, conducted in July, 2011 a universal distribution campaign where approximately 5 million of nets were distributed. But after this mass-distribution, questions arise: Do people effectively use or not use the mosquito nets freely distributed? To clarify these questions, this study was conducted on LLINs coverage, use and physical condition in Benin one year after their distribution. The households were randomly selected from 32 clusters. Data on bed net ownership and usage, physical condition of the nets, other characters and issues related to sourcing were asked of all targets to assess the origins of LLIN found at the household level. Of the total surveyed, 88.96% had at least one LLIN. 87.19% of these nets come from the last campaign, 9.1% were from pregnant women voucher clinic delivery systems and 3.20% were purchased full price. 84% of the nets were reportedly used the night preceding the survey. Around 89% of the total of LLINs observed was in good condition. The universal distribution campaign in Benin has significantly increased LLIN coverage and ownership policy in the community.

Key words: Long-lasting insecticidal nets (LLINs), coverage, use, physical integrity, Benin.

INTRODUCTION

Long-lasting insecticidal nets (LLINs) have proved to be an important tool for the control of malaria and other

*Corresponding author. E-mail: filemont@yahoo.fr. Tel: (229) 97272631. Fax: (229) 21333930.

vector-borne diseases (World Health Organisation (WHO), 2005). Several studies in malaria endemic countries have shown the usefulness of LLINs in reducing man-vector contact from malaria (Greenwood et al., 2005; Lengeler, 2004; Eisele et al., 2006; Thwing et al., 2008). It is a technology based on the slow release of pyrethroid insecticides, rendering it wash-resistant and extending insecticide residual effectiveness to at least three years without the need of re-treatment. This is why the recent objective of roll back malaria (RBM) focuses duplication of efforts including maintaining universal coverage of nets to achieve a 75% reduction compared to 2000, the number of reported malaria cases in endemic countries in the African region, 2015 (OMS, 2011; AFR/RC50/12 – WHO, 2012).

Benin, by its National Malaria Control Program, supported since 2000 the initiative RBM and conducted in July, 2011 a universal distribution campaign where approximately 5 million of nets were distributed. This distribution is intended to significantly increase the national coverage of insecticide-treated nets. Before the distribution, the proportion of households owning at least one net at national level was estimated at 52% (PNLP- AFRICARE BENIN-CRS BENIN, 2010). After the distribution of July, 2011, this proportion was around 86.4% (PNLP, 2011). In the net level analysis, factors independently associated in both surveys with reduced likelihood that a net would be used were: increasing net age, increasing damage of nets, increasing household net density (nets/person). Some studies have shown that several factors are associated with LLIN ownership and effective use (Graves et al., 2011). Factors associated with ownership were assumed to be: cultural beliefs and practices mechanisms of LLIN distribution and distance to LLIN suppliers, rumours about LLINs and social support and pressure (Wiseman et al., 2007; Baume and Marin, 2007). But factors associated with net used were reported to be: perceived benefits and disadvantages of nets, trust in health workers providing health education and LLINs, knowledge of appropriate net use/care practices, and net-hanging skills, household size and composition, the number of children under five years of age and use of other vector control measures (Toé et al., 2009; Edelu et al., 2010). Other studies conducted in Benin showed that several mosquito nets after 12 month of use had already holes (Gnanguenon, personnal communication). From these observations, questions arise: Do people effectively use the mosquito nets freely distributed? Or do people not use LLINs to their insufficient number or their poor physical condition? To clarify these questions, we conducted a study on insecticide-treated nets coverage, use and physical condition in plateau department in southern Benin one year after the distribution. This study aimed to provide useful data on the effectiveness of the distribution

campaign.

METHODOLOGY

Study area

Plateau is a county of Benin in West Africa. The selection of this county was based on its geographic accessibility, the high use of mosquito nets by children under 5. Entomological surveys conducted in the plateau have shown that there are both high and low pyrethroids resistance areas (Yadouleton et al., 2010). According to the general report of the distribution campaign, 85.5% of the households received a LLIN with an average of 2.7 LLINs/Household. Ketou, Pobè, Adja-Ouere, Ifangni and Sakete are the top 5 cities that compose it. But our study was focused on only four districts (Ketou, Pobè, Ifangni and Sakete). Ifangni district is located at $2^{\circ} 43' 14"E$ and $6^{\circ} 38' 56"N$; its area is 242 km^2 representing 7.28% of Plateau territory. Sakete district is located at $2^{\circ} 39' 7"E$ and $6^{\circ} 46' 3"N$; covering an area of 432 km^2 , it represents 13.29% of plateau territory. Ketou is located is at $2^{\circ} 36' 4"E$ and $7^{\circ} 27' 21"N$; it has an area of 1775 km^2 , representing 54.38% of Plateau county's area. Pobè district is located at $2^{\circ} 41' 51"E$ and $7^{\circ} 5' 12"N$; it has an area of 400 km^2 , representing 11% of the county's area. 32 rural villages were selected through all four districts (Figure 1).

Study design

Larvae prospection's for insecticides susceptibility tests on *Anopheles gambiae*, main malaria vector in Benin have been conducted in many villages of the targeted districts. This baseline study on the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the department of Plateau helped to make the choice of sentinel villages where various activities were held in our work. A total of 32 clusters were selected including 17 clusters at Ifangni, 6 at Sakété, 2 at Pobè and 8 at Kétou. Each cluster (village) was composed of several hamlets and comprised a minimum of 100 Children under five years old. Household cross-sectional surveys were undertaken in each cluster in May and August, 2012, conducting during high malaria transmission period. The survey covered the targeted groups in different villages. The choice of the targeted population has followed the standards set in the collection of basic data on morbidity and mortality due to malaria in the monitoring/evaluation RBM/RBM in Benin in 2004 (Kinde-Gazard et al., 2004). The targeted persons by cluster were: 30 mothers of children or care for children less than 5 years to evaluate fever or malaria during the last two weeks, 25 Pregnant women in the third trimester of pregnancy and women who gave birth in the last 6 months to assess malaria prevention, 30 householders for the availability and use of LLINs.

The households were randomly selected from each cluster. Data on bed net ownership and usage, physical condition of the nets, demographics of household members, other characters and issues related to sourcing were asked of all targets to assess the origins of LLIN found at the household level. Data were gathered using an adapted version of the standard Malaria Indicator Survey (RBM, 2013). Specific questions relating to the Universal Campaign Coverage process were asked to the householder and to the mothers of children or care for children less than 5 years. The physical condition of the nets was estimated using one of the two indicators recommended by WHO: the proportion of LLINs with any hole(s) (WHO, 2011). The main hole category in the LLINs was recorded as follows:

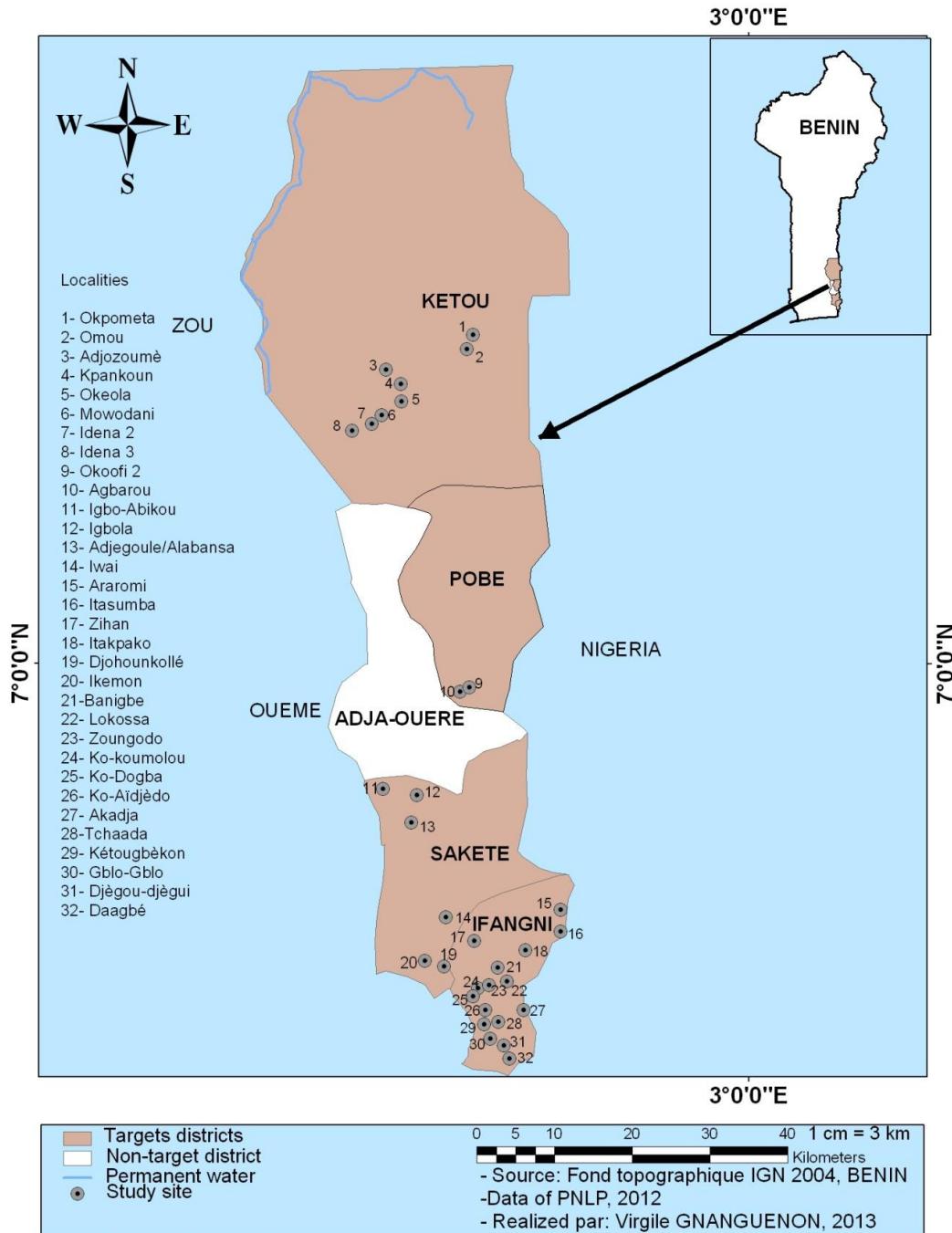


Figure 1. Map showing the study villages in Plateau department (Benin).

T1: holes size < thumb (0.5 to 2 cm);
T2: holes size > thumb < fist (2 to 10 cm);
T3: holes size > fist < head (10 to 25 cm);
T4: holes size > head (> 25 cm).

Statistical analysis

Interviews were conducted using questions. At the end of the survey, data were recorded with Epi-Info and data were transferred

Table 1. Background characteristics of the households surveyed.

Characteristic	Frequency (%)
Sex of the heads of households (n = 960)	
Male	386 (40.20)
Female	574 (59.80)
Educational level of the heads of households	
Illiterate	655 (68.23)
Elementary	188 (19.58)
Post elementary	117 (12.19)
Household size (n = 4688)	
Children under 5 years	1339 (28.56)
Pregnant women	800 (17.06)
Person over 5 years	2549 (54.37)

into SPSS 16.0 software. The investigators had cleaned and analysed the data using the same software program. Household ownership of LLIN was calculated as a proportion of households having at least one LLIN among the total surveyed households. LLIN use was estimated as the proportion of households using at least one LLIN in the LLIN owning households. Once the LLIN ownership and use were determined; the data were filtered into a separate file of LLIN owned households. Then, households using LLINs were compared to those who did not use any to identify the factors associated with LLINs non-use. Barriers of LLIN use were determined by using enter method multivariate logistic regression model. Data on the physical integrity of LLINs and those relating to the origins of LLINs were extracted. The various holes observed were divided into four and frequencies were estimated to assess the general condition of operation of LLINs (WHO, 2011; Kilian, 2012).

Ethics approval

This study was planned and approved by the Ministry of Health. The protocol was also reviewed and approved by National Ethics Committee for Health Research at the Ministry of Health. A briefing note indicating the objectives of the study, the advantages and disadvantages was given to the respondents in order to obtain consent. Confidentiality was respected and questionnaires were anonymous.

RESULTS

Study households characteristics

960 households and 4688 people were included in the survey and the response rate was 100% (Table 1). 59.80% of the heads of households interviewed were females versus 40.20% of males. 68.23% of the heads of households were illiterate, 19.58% have elementary school degree and 12.19% have an educational level over elementary school degree. Of the 4688 people included (Table 1), 1339 (28.56%) were under five years old; 800 (17.06%) were reported to be pregnant women

and 2549 (54.37%) were people over five years old (without pregnant women).

LLINs ownership

Of the total surveyed households, 88.96% had at least one LLIN while 11.04% did not have any type of mosquito nets. The majority of households that owned LLIN had either one or two LLINs irrespective of their household size. 28.22% (25.47 to 31.16) had one LLIN, 31.85% (29.00 to 34.89) had two LLINs, 16.76% (14.54 to 19.27) had three LLINs and 12.18% (10.27 to 14.41) had four LLINs. The number of ITNs did not vary significantly between cluster (Table 2) and the average LLIN ownership among LLIN owned household was 1.82 (Table 2). 87.19% (84.76 to 89.27) of these nets come from the National distribution campaign of 2011, 9.1% (7.79 to 11.78) were from pregnant women voucher clinic delivery systems and 3.20% (2.21 to 4.61) were purchased full price (Figure 2).

Factors associated with ITN ownership

The sex of the heads of households (male and female) as well as their education level were not associated with ITN ownership ($p > 0.05$). Also, the composition of the household size in children under five, pregnant women and persons over five years old was not associated with ITN ownership ($p > 0.05$) (Table 3).

ITNs utilization

Of the total of 1746 reported LLINs, 42.96% ($n = 750$) LLINs were observed by the surveyors. 84% of the nets were reportedly used the night preceding the survey. The

Table 2. LLINs ownership by cluster.

Parameter	Cluster	LLINs	No. of households	Mean	CI 95%
Ketou	Okpometa	52	30	1.73	[1.40-2.05]
	Omou	69	30	2.3	[2.03-2.56]
	Adjozounme	82	30	2.73	[2.54-2.92]
	Kpankoun	59	30	1.97	[1.69-2.25]
	Oke Ola	38	30	1.27	[1.02-1.52]
	Mowodani	74	30	2.47	[2.24-2.70]
	Idena2	45	30	1.5	[1.11-1.88]
	Idena3	49	30	1.63	[1.24-2.01]
Pobe	Okoffi 2	73	30	2.43	[2.20-2.75]
	Agbarou	44	30	1.47	[1.11-1.82]
Sakete	Igboabikou	39	30	1.3	[1.04-1.55]
	Igbola	54	30	1.8	[1.44-2.15]
	Adjegounle/Alabansa	48	30	1.6	[1.22-1.97]
	Iwai	61	30	2.03	[1.68-2.37]
	Ikemon	52	30	1.73	[1.51-1.94]
	Djohounkolle	53	30	1.77	[1.51-2.02]
Ifangni	Akadja	69	30	2.3	[2.08-2.51]
	Araromi	40	30	1.33	[0.92-1.73]
	Banigbe	48	30	1.6	[1.28-1.91]
	Daagbe	49	30	1.63	[1.23-2.02]
	Djegou Djedji	65	30	2.17	[1.93-2.40]
	Gblo Gblo	23	30	0.77	[0.43-1.10]
	Ita Kpako	59	30	1.97	[1.62-2.32]
	Itassumba	56	30	1.87	[1.54-2.19]
	Ketougbekon	47	30	1.57	[1.24-1.90]
	Ko Dogba	56	30	1.87	[1.54-2.19]
	Ko-Aidjedo	70	30	2.33	[2.12-2.54]
	Kokoumolou	51	30	1.7	[1.42-1.97]
	Lokossa	42	30	1.4	[1.00-1.79]
	Tchaada	64	30	2.13	[1.85-2.40]
	Zian	70	30	2.33	[1.98-2.67]
	Zougoudo	45	30	1.5	[1.09-1.90]
Total		1746	960	1.82	[1.76-1.87]

CI = confidence interval.

proportion of nets in use varies from 47 to 100%, but not significantly different from one cluster to another (Table 4). It was only at Araromi that the level of net use was significantly low compared to other clusters. Among the target groups, 76.4% (73.46 to 79.34) of pregnant women really used LLINs, 82.88% (80.87 to 84.91) children under 5 years used nets while 69.78% (68.22 to 71.34) people over 5 years were reported as using LLINs (Figure 3). On the 807 LLINs observed, around 16% was

found with hole(s) (Table 5). No significant difference was observed between categories of holes (T1 to T4) and while comparing the physical condition of the nets by the level of instruction of their owners ($p < 0.05$).

DISCUSSION

ITNs coverage was increased by the universal distribution

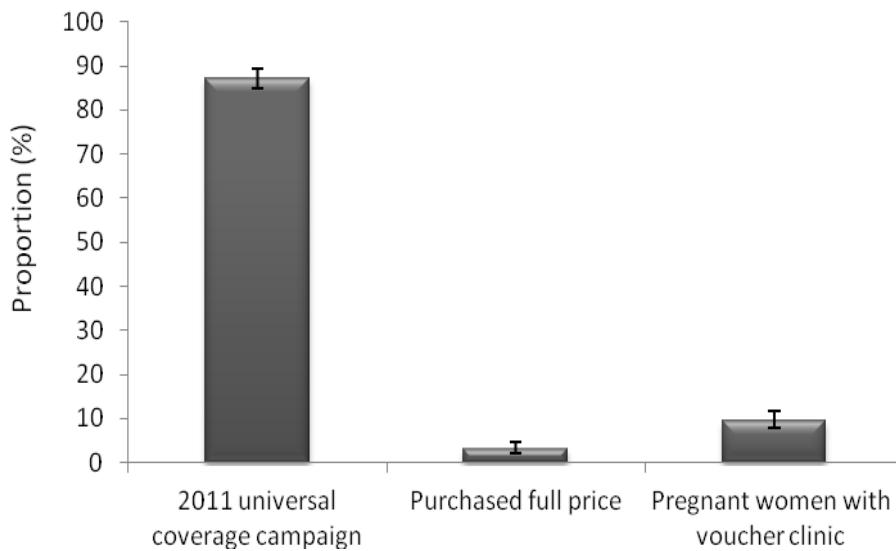


Figure 2. Source of ITN ownership.

Table 3. Multivariate regression on ITN ownership.

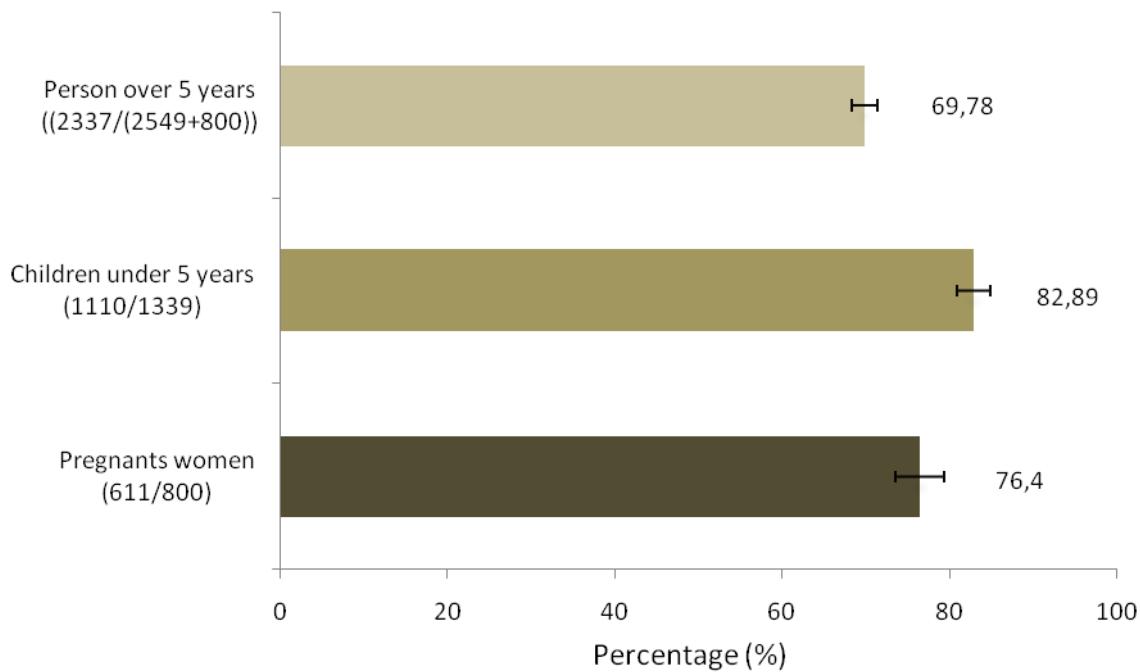
Factors	% ITN ownership (n)	CI = 95%	p-value
Heads of households	88.96 (854)		
Sex of the heads of households			
Male	43.85 (421)	[40.72-46.99]	0.680
Female	45.10 (433)	[41.96-48.25]	
Educational level of the heads of households			
Illiterate	60.31 (579)	[57.22-63.41]	
Elementary	17.5 (168)	[15.10-19.90]	0.332
Post elementary	11.15 (107)	[9.16-13.14]	

n = number CI = Confidence Interval.

distribution campaign with a proportion of 88.96% of households that owned at least one ITN. This proportion is higher when compared to the preceding distribution campaign evaluation (Tokponnon et al., 2013), and the average number of ITNs per household was around 2. Mosquito nets (LLINs) that were from the distribution campaign were significantly higher (87%) comparatively to those that were purchased full price (3%) or received from pregnant women antenatal consultation (9%). In our study, the average number of LLINs per household visited was 1.82 considering the 960 households. The average household size was 4.88 people visited. Thus we can say that about two nets are available for 5 people at the household level. However, the objective of this

campaign is to increase the distribution level of 56% coverage (PNLP, 2012) at least 80% and have a LLIN for two people in the general population.

In the protocol of the LLIN distribution campaign of July, 2011, households of two people were covered with two LLINs and this rule has been well respected in rural areas in which the distribution has been fewer problems (Tokponnon et al., 2013). Our observations were consistent with the same requirements a year after the campaign. A disadvantage of the distribution was that 11% of households did not receive LLINs (PNLP, 2012). There were no significant differences between the availability of LLINs in different villages when considering the proportion of households with at least two LLINs. This

**Figure 3.** Net usages in target and non target group.**Table 4.** Multivariate regression on ITN use.

Districts	Clusters	LLIN utilization			Proportion M+ (%)	OR	—	p
		M-	M+	Total				
Ketou	Okpometa	7	23	30	77	3.75	0.0194	
	Omou	1	29	30	97	33.14	0.0012	
	Adjozounme	0	30	30	100	69.41	0.0039	
	Kpankoun	3	27	30	90	10.26	0.001	
	Oke Ola	7	23	30	77	3.75	0.0194	
	Mowodani	9	21	30	70	2.66	0.0698	
	Idena 2	10	20	30	67	2.28	0.1208	
	Idena 3	8	22	30	73	3.14	0.0379	
Pobe	Okoffi 2	4	26	30	87	7.42	0.002	
	Agbarou	13	17	30	57	1.49	0.4391	
Sakete	Igboabikou	3	27	30	90	10.26	0.001	
	Igbola	4	26	30	87	7.42	0.002	
	Adjegounle/Alabansa	11	19	30	63	1.97	0.1967	
	Iwai	4	26	30	87	7.42	0.002	
	Ikemon	1	29	30	97	33.14	0.0012	
	Djohounkolle	5	25	30	83	5.71	0.0044	
Ifangni	Akadja	6	24	30	80	4.5714	0.0094	
	Araromi	16	14	30	47	1	-	
	Banigbe	6	24	30	80	4.5714	0.0094	
	Daagbe	9	21	30	70	2.66	0.0698	

Table 4. Contd.

Djegou - Djegi	6	24	30	80	4.5714	0.0094
Gblo-Gblo	14	16	30	53	1.3	0.6058
Ita - Kpako	0	30	30	100	69.41	0.0039
Itassumba	2	28	30	93	16	0.0007
Ketougbekon	11	19	30	63	1.97	0.1967
Ko Dogba	9	21	30	70	2.66	0.0698
Ko Aïdjedo	0	30	30	100	69.41	0.0039
Kokoumolou	9	21	30	70	2.66	0.0698
Lokossa	10	20	30	67	2.28	0.1208
Tchaada	9	21	30	70	2.66	0.0698
Zian	2	28	30	93	16	0.0007
Zougoudo	9	21	30	70	2.66	0.0698
Total	208	752	960	78.3		

M+: household who's everybody use LLIN the days before survey. M-: household who's not everybody use LLIN the days before survey. OR: odd ratio; Significant at p < 0.05 level.

Table 5. Physical condition of LLINs.

Level of instruction	LLINs without hole	LLINs with holes				Total LLINs with hole(s)	% LLINs with holes
		T1	T2	T3	T4		
Illiteracy	542	28	52	15	11	106	16,36
Primary school	163	10	12	3	3	28	14,66
Post primary school	102	7	3	4	1	15	12,82
Total	807	45	67	22	15	149	15,58

proportion was higher compared to those with three or four due to the fact that LLIN distribution campaign has limited the number of nets distributed for two people and a maximum of 8 LLINs for large households at the same size.

This observation is a good performance and the coverage attained was similar to what has been achieved in other countries (Tanzania, Nigeria and Togo) (West et al., 2012; Stevens et al., 2013). Continuous distribution of LLINs to pregnant women and children under five is an important way to increase nets coverage and replace torn nets (RBM, 2011). An additional continuous distribution system, via NGOs for example, can also be planned for other households. 78% of the net observed were reported to be used the previous night, and the proportion of nets use did not vary significantly between clusters, suggesting that awareness for net use was a success. But full net used by target group was not achieved.

76.4% of pregnant women were using ITNs while only 82.88% of children under five were using ITNs. This observation suggests that net usage could be improved in target group.

The high ITNs usage could be a consequence of the increased availability of ITNs at the household level due to the universal distribution campaign. This observation has already been noticed in Tanzania by West and colleagues (West et al., 2012). The level of ITN use could also be influenced by high temperature and mosquito density (Graves et al., 2011). But comparatively to other studies, ITN usage observed in target group in this study was higher than those observed in Tanzania and Nigeria (Ye et al., 2012; West et al., 2012). ITN ownership and use seems to reflect the general coverage and ITNs ownership in the whole population. The proportion of LLINs from the distribution campaign found in good condition was significantly higher than those observed in serviceable condition or torn out.

Conclusion

The universal distribution campaign in Benin has significantly increased ITN coverage and ownership policy in the community. Non target persons and target

persons (pregnant women and children under five) had similar level in ITN ownership and usage. The level of ITN ownership and usage were also similar between villages. This is an important indicator of universal coverage goal. But additional effort must be done to fully achieve universal coverage goal, and routine distribution must be used to maintain ITN coverage.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the WHO and Bill & Melinda Gates Foundation which supported financially this study. The authors would also like to thank the populations of 32 clusters, the team of health system in the Plateau department, and the investigators for their collaboration.

REFERENCES

- AFR/RC50/12 - WHO (2012). Regional Office for Africa [http://www.afro.who.int/fr/downloads/doc_details/1106-afrrc5012.html?impl=component].
- Baume CA, Marin MC (2007). Intra-household mosquito net use in Ethiopia, Ghana, Mali, Nigeria, Senegal, and Zambia: are nets being used? Who in the household uses them? Am. J. Trop. Med. Hyg. 77:963–971.
- Edelu B, Ikefuna A, Emodi J, Adimora G (2010). Awareness and use of insecticide-treated bed nets among children attending outpatient clinic at UNTH, Enugu - the need for an effective mobilization process. Afr. Health Sci. 10:117–119.
- Eisele TP, Macintyre K, Yukich J, Ghebremeskel T (2006). Interpreting household survey data intended to measure insecticide-treated bednet coverage: results from two surveys in Eritrea. Malar. J. 5:36.
- Graves PM, Ngondi JM, Hwang J, Getachew A, Gebre T, Mosher AW, Patterson AE, Shargie EB, Tadesse Z, Wolkon A, Reithinger R, Emerson PM, Richards FO (2011). Factors associated with mosquito net use by individuals in households owning nets in Ethiopia. Malar. J. 10:354.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT (2005). Malaria. Lancet 365:1487–1498.
- Kilian A (2012). Textile Testing Methods for Nets.
- Kinde-Gazard D, Gbenou D, Tohon S, Da Silva C, Nahum A, Quenum A, Houdigande E, Houndekon R, Ekoue S, Massougbedji A (2004). Indicateurs de suivi et d'évaluation en 2001 de l'initiative Faire reculer le paludisme au Bénin. Bull. Soc. Pathol. Exot. 97:349–352.
- Lengeler C (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. Cochrane Database Syst. Rev. CD000363.
- OMS (2011). Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde [http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/fr/]
- PNLP-AFRICARE BENIN-CRS BENINRS (2010). Evaluation Finale Du Projet D'appui à La Lutte Contre Le Paludisme. Cotonou, 42p.
- PNLP (2011). Evaluation post campagne de la distribution gratuite de MIILD en 2011 au Bénin. Cotonou, 58p.
- PNLP (2012). Campagne de Distribution Gratuite Des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée D'action Aux Ménages Du Bénin. Cotonou: Ministère de la Santé. 11p.
- RBM (2011). Continuous LLIN Distributions: A Guide to Concepts and Planning/ K4Health [http://www.k4health.org/toolkits/continuous-distribution-malaria/continuous-lin-distributions-guide-concepts-and-planning].
- RBM (2013). Malaria Indicator Surveys - Access to Reports, MIS Datasets, Survey Information [http://www.malaria-surveys.org/surveys.cfm].
- Stevens ER, Aldridge A, Degbey Y, Pignandi A, Dorkenoo MA, Hugelen-Padin J (2013). Evaluation of the 2011 long-lasting, insecticide-treated net distribution for universal coverage in Togo. Malar. J. 12:162.
- Thwing J, Hochberg N, Vanden Eng J, Issifi S, Eliades MJ, Minkoulou E, Wolkon A, Gado H, Ibrahim O, Newman RD, Lama M (2008). Insecticide-treated net ownership and usage in Niger after a nationwide integrated campaign. Trop. Med. Int. Health 13:827–834.
- Toé LP, Skovmand O, Dabiré KR, Diabaté A, Diallo Y, Guiguemdé TR, Doannio JM, Akogbeto M, Baldet T, Gruénais M-E (2009). Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. Malar. J. 8:175.
- Tokponnon F, Aholoukpe B, Denon E, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Kinde-Gazard D, Akogbeto M (2013). Evaluation of the coverage and effective use rate of Long-Lasting Insecticidal Nets after Nation-wide scale up of their distribution in Benin. Parasit. Vectors., 6:265.
- West PA, Protopopoff N, Rowland MW, Kirby MJ, Oxborough RM, Mosha FW, Malima R, Kleinschmidt I (2012). Evaluation of a national universal coverage campaign of long-lasting insecticidal nets in a rural district in North-west Tanzania. Malar. J. 11:273.
- WHO (2005). World Malaria Report 2005. [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241593199/en/]
- WHO (2011). Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions. [http://apps.who.int/iris/handle/10665/44610]
- Wiseman V, Scott A, McElroy B, Conteh L, Stevens W (2007). Determinants of bed net use in the Gambia: implications for malaria control. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76:830–836.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-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.
- Ye Y, Patton E, Kilian A, Dovey S, Eckert E (2012). Can universal insecticide-treated net campaigns achieve equity in coverage and use? the case of northern Nigeria. Malar. J. 11:32.

RESEARCH

Open Access

Impact of long-lasting, insecticidal nets on anaemia and prevalence of *Plasmodium falciparum* among children under five years in areas with highly resistant malaria vectors

Filémon T Tokponnon^{1,2,5,6*}, Aurore Hounto Ogouyémi³, Yolande Sissinto³, Arthur Sovi^{5,6}, Virgile Gnanguenon^{5,6}, Sylvie Cornélie⁷, Adicath Adéola Adéothy³, Razaki Osse^{5,6}, Abel Wakpo³, Dina Gbénou⁴, Mariam Oke^{1,2}, Dorothée Kinde-Gazard², Immo Kleinschmidt⁸, Martin C Akogbeto^{5,6} and Achille Massougbedji³

Abstract

Background: The widespread use of insecticide-treated nets (LLINs) leads to the development of vector resistance to insecticide. This resistance can reduce the effectiveness of LLIN-based interventions and perhaps reverse progress in reducing malaria morbidity. To prevent such difficulty, it is important to know the real impact of resistance in the effectiveness of mosquito nets. Therefore, an assessment of LLIN efficacy was conducted in malaria prevention among children in high and low resistance areas.

Methods: The study was conducted in four rural districts and included 32 villages categorized as low or high resistance areas in Plateau Department, south-western Benin. Larvae collection was conducted to measure vector susceptibility to deltamethrin and knockdown resistance (*kdr*) frequency. In each resistance area, around 500 children were selected to measure the prevalence of malaria infection as well as the prevalence of anaemia associated with the use of LLINs.

Results: Observed mortalities of *Anopheles gambiae* s.s population exposed to deltamethrin ranged from 19 to 96%. Knockdown resistance frequency was between 38 and 84%. The prevalence of malaria infection in children under five years was 22.4% (19.9–25.1). This prevalence was 17.3% (14.2–20.9) in areas of high resistance and 27.1% (23.5–31.1) in areas of low resistance ($p = 0.04$). Eight on ten children that were aged six - 30 months against seven on ten of those aged 31–59 months were anaemic. The anaemia observed in the six to 30-month old children was significantly higher than in the 31–59 month old children ($p = 0.00$) but no difference associated with resistance areas was observed ($p = 0.35$). The net use rate was 71%. The risk of having malaria was significantly reduced ($p < 0.05$) with LLIN use in both low and high resistance areas. The preventive effect of LLINs in high resistance areas was 60% (95% CI: 40–70), and was significantly higher than that observed in low resistance areas ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the resistance of malaria vectors seems to date not have affected the impact of LLINs and the use of LLINs was highly associated with reduced malaria prevalence irrespective of resistance.

Keywords: Malaria, Prevalence of *Plasmodium falciparum*, Anaemia, Resistance, LLINs

* Correspondence: filemont@yahoo.fr

¹National Malaria Control Programme, Cotonou, Benin

²Ministry of Health, Cotonou, Benin

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

Background

Malaria remains a deadly endemic disease and a growing concern around the world [1]. Its control is based on both preventing transmission and promptly treating infection. Insecticide-treated nets (LLINs) are effective tools for malaria prevention and can significantly reduce severe disease and mortality due to malaria, especially among children aged under five years in endemic areas [2].

LLINs have a community effect by reducing the longevity of malaria vectors [3]. Many countries in the past decade have made significant progress in preventing malaria by largely focusing on vector control through LLINs and indoor residual spraying (IRS) of insecticides. Several strategies, including free distribution to target groups [4,5] and free, universal, population-based distribution campaigns, target an entire population at risk [4,6]. It is estimated that between 2000 and 2010, LLINs has saved more than 908,000 lives, and since 2006, prevented three-quarters of deaths due to malaria [7]. However, the widespread use of LLINs leads to the development of vector resistance to insecticide. This insecticide resistance can reduce the effectiveness of these interventions and perhaps reverse progress in reducing malaria morbidity [8]. Although resistance may be inevitable with effective control programmes, new strategies must be developed to reduce the development and spread of insecticide resistance and preserve the effectiveness of currently available insecticides and malaria control interventions. It is obvious that increasing the level of resistance corresponds to a decrease in the effectiveness of vector control strategies implementation [9].

Benin is currently involved in a national campaign of free distribution of LLINs for universal access. In July 2011, an average of 86% of households were covered throughout the country [10]. The first cases of resistant vectors were noted before 2000 in several localities [11-14]. With the massive use of insecticides in both public health and agriculture [15] the level of resistance has considerably increased and in localities where vectors were susceptible to becoming resistant [12].

Recent studies show that pyrethroid treatments failed to kill resistant vectors in experimental trials of LLINs where the main brands of nets were used (Permanet 2.0 and Olyset net) [16]. Household protection with holed LLINs was lost in areas where vectors were resistant to pyrethroids [17] and an average of five *Anopheles gambiae sensu lato* (s.l.) by night can enter torn nets at a proportionate hole index of 276 [18]. Additionally, studies showed that reductions in haemoglobin levels in endemic areas were created by malaria infections [19,20], thus, it was not possible to clearly separate the effects of parasites from those of anaemia on the resulting

measurements of vectors in the transmission. Resistance is on the rise and that is a real threat to the vector control interventions that are currently used and that in high coverage have shown to lead to excellent results. But there is very little data at the moment that helps us judge if this resistance translates to reduced malaria indicators.

Therefore, it was important to assess the impact of vector resistance and LLIN use on malaria prevalence in the community. The objectives of this study were to: i) determine *An. gambiae* susceptibility to deltamethrin and knockdown resistance (*Kdr*) frequency; ii) assess the prevalence of malaria infection; iii) measure the LLIN use rate; iv) assess the prevalence of anaemia among children aged six to 59 months, and v) compare the different indicators in low and high insecticides resistance areas.

Methods

Study area

The study was conducted in four rural districts belonging to two health regions (Ifangni-Sakete and Pobe-Ketou) in Plateau Department, south-western Benin. This area is characterized by two rainy seasons (April to July and September to November) and two dry seasons (December to March and August to September). The selection of this Department was based on its geographic accessibility and the high use of mosquito nets by children aged under five years. Entomological surveys conducted in Plateau Department showed that there are two categories of localities: those with low resistance and those with high resistance by vectors to pyrethroids [13]. According to the report of the LLIN distribution campaign, 85.5% of households received an LLIN, with an average of 2.70 LLINs/household [10]. The four districts selected were Ifangni, Sakete, Ketou, and Pobe.

Ifangni district is located at 2°43'14"E and 6°38'56"N; its area is 242 sq km representing 7.28% of Plateau territory. Sakete is located at 2°39'7"E and 6°46'3"N, covering an area of 432 sq km, and represents 13.29% of Plateau territory. Ketou is at 2°36'4"E and 7°27'21"N, with an area of 1,775 sq km, representing 54.38% of Plateau territory. Pobe is at 2°41'51"E and 7°5'12"N and has an area of 400 sq km that represents 11% of Plateau territory. Thirty-two rural villages were selected through the four districts (Figure 1).

Study design

Before the study began, WHO susceptibility tests were performed on *An. gambiae* using deltamethrin to select the villages (clusters) where activities were held. Table 1 shows the distribution of the villages based on the mortalities observed with deltamethrin in 2011. Due to the absence of an area where *An. gambiae* are fully

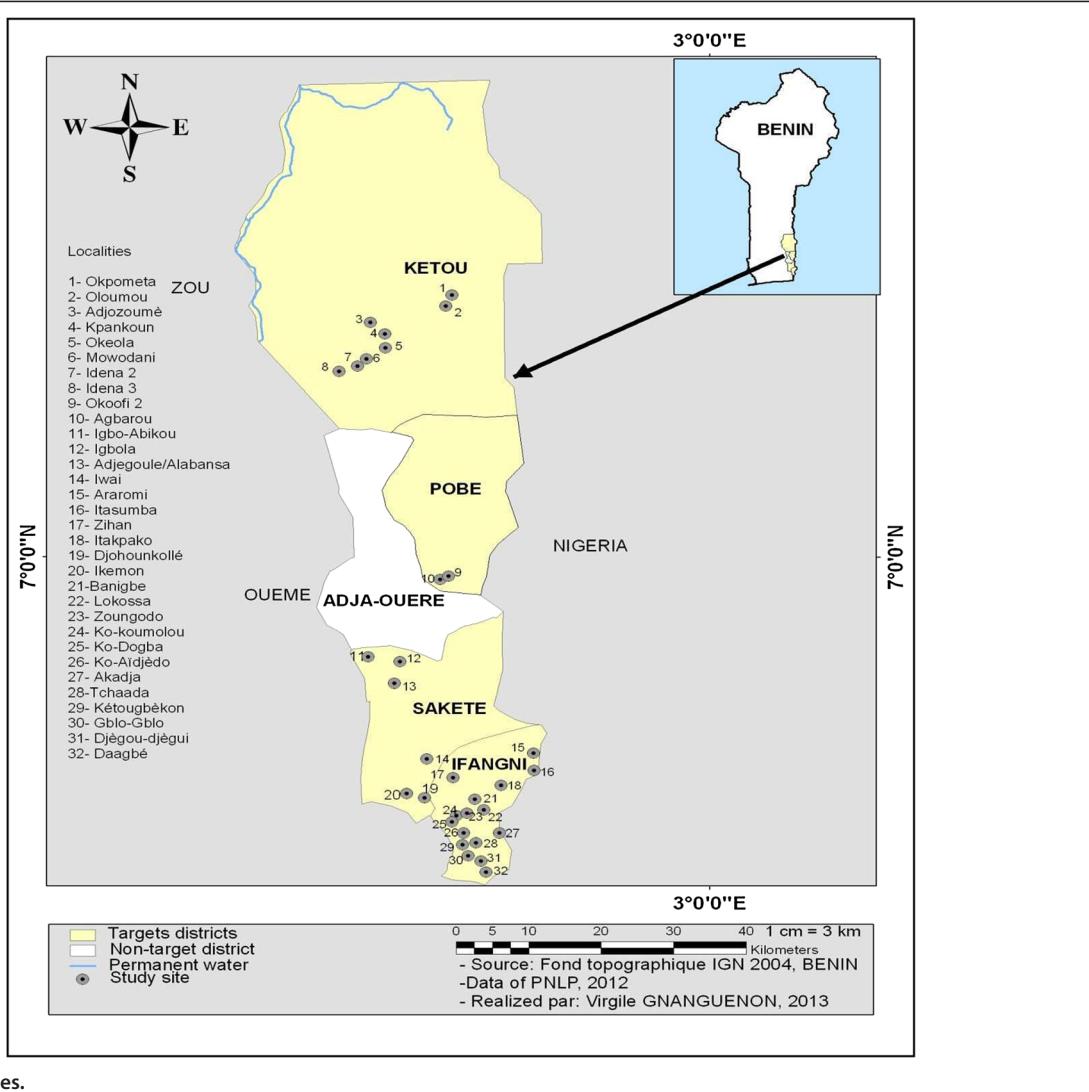


Figure 1 Study sites.

susceptible to pyrethroids in Benin (Djègbè, pers comm), criteria were used to categorize the level of resistance. “R+++ area” was called an area where the observed mortality was between 0 and 60% and “R+ area” an area where the observed mortality ranged 80 to 100%. These two areas were identified based on baseline resistance data collected in Plateau Department (Djègbè, pers comm). Thus, 16 villages of high resistance and 16 villages of low resistance were selected to host the work. Note that most of the villages included in the study were located at Ifangni district, and mainly low resistance villages (Table 1).

Each cluster (village) was composed of several hamlets and included a minimum of 100 children under five years old. Cross-sectional surveys were conducted in each cluster in May to August 2012, during the high malaria transmission period. The surveys covered the targeted groups in different villages. In each cluster, 40

children less than five years old, 25 pregnant women, 30 children over five years old, and adult heads of household were selected. The results reported here were for those of children under five years old and were analysed with vector resistance data from for the same period.

Larvae collection of *An. gambiae* s.l. in seven villages was not productive during the study period to observe resistance level of the mosquitoes. These villages were dropped from data analysis. For this, the work was continued in 25 villages. Before starting the survey, training of investigators (laboratory technicians, nurses and other staff) followed by a pretest questionnaire was performed. In the field, after the approval of the chiefs of villages, investigators sampled randomly the survey households by selecting one house in every two in each village. Interviews were conducted through a questionnaire provided by investigators, and was followed by the realization of blood smear and haemoglobin test by

Table 1 Distribution of the clusters based on the low or high resistance status in 2011 according the districts

Districts	IFANGNI (16)	SAKETE (06)	POBE (02)	KETOU (08)
	Itassoumba*	Iwai*	Okoofiz [#]	Adjozoumè*
	Itakpako*	Igbola [#]	Agbarou*	Mowodani [#]
	Ko Koumolou*	Ikémón [#]		Idéna ^{2#}
	Ko Aidjèdo*	Igbo-abikou [#]		Idena ^{3#}
	Kétougbehkon*	Alabansa [#]		Kpankoun [#]
	Lokossa*	Djohounkollé*		Okpometa [#]
Clusters	Ko-Dogba*			Okeola [#]
	Zoungodo*			Omou*
	Zihan*			
	Araromi*			
	Daagbé*			
	Akadja [#]			
	Tchaada [#]			
	Banigbé centre [#]			
	Djégou-Djègi [#]			
	GbloGblo [#]			
	Zoungodo*			

*Low resistance area (R⁺) (80-100%); [#]High resistance area (R⁺⁺⁺) (0-60%).

laboratory technicians. Information on the use of LLINs by households was verified during the investigation. Indeed, in each village, about a questionnaire, households were interviewed about LLINs ownership and their use. People who use them are those who reported having slept under LLINs the previous night of the survey.

Data collection

Collection of *Anopheles gambiae* larvae

Larvae of *An. gambiae* were collected in all villages by the “dipping” method, which involves capturing mosquito larvae directly in their productive breeding sites using a simple ladle. These breeding sites were the puddles and located near the different villages. The larvae and pupae were kept separately in labelled bottles and were reared in the insectarium of Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) until they emerged into adults mosquitoes. Females aged from two to five days were used for WHO susceptibility bioassay under laboratory conditions ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $80 \pm 4\%$ relative humidity).

Susceptibility of *Anopheles gambiae* to deltamethrin

Phenotypic determination of the level of resistance was done using susceptibility tests (bioassays cylinder tube) according to WHO guidelines [21]. This susceptibility test was performed using unfed females of *An. gambiae s.l.*, aged two to five days. The bioassays were carried out with impregnated papers of deltamethrin (0.05%). Four

batches of twenty-five females were introduced into treatment tubes for 60 min. Two batches exposed to untreated papers were used as control. The number of knocked-down mosquitoes was recorded every 10 min during the period of exposure. After 60 min exposure, the mosquitoes were transferred into observation tubes and were fed with 10% honey solution then maintained in observation for 24 hours. At the end of the observation period, mortality rate was calculated. According to WHO technical guidelines [21], a mortality rate higher than 97% means that the population of mosquitoes tested is susceptible; a mortality rate between 90 and 97% means there is a suspicion of resistance and a mortality rate lower than 90% means the mosquito population tested is resistant. After the tests, the dead and living mosquitoes were conserved separately on silica gel and stored at -20°C for molecular characterization by PCR.

Characterization of the populations of *Anopheles gambiae* by PCR: species, molecular form and *Kdr* Leu-phe mutation

Approximately 16–126 females of *An. gambiae* from each village resulting from the susceptibility tests were analysed by PCR. DNA from control (non-exposed) mosquitoes was extracted individually by CTAB technique. Species among *An. gambiae* complex and molecular form were determined by PCR [22,23]. *Kdr* mutation was determined by HOLA technique described by Lynd *et al.* [24]. This technique allowed the detecting of *Kdr* mutation.

Realization of blood smear and thick film

Thick film and blood smear were performed in villages by laboratory technicians from blood collected by phlebotomy after puncture children’s finger by lancets. The slides were identified and sprawl were dried and stored in boxes slides for their delivery to the laboratory.

Laboratory examination of slides

The slides were brought to the laboratory for a double reading by trained technicians. Parasitological infection was detected on 10% Giemsa-stained thick smears. A sexual stage of each *Plasmodium* species was counted in the blood volume occupied by 200 leucocytes and parasite density was calculated by assuming 8,000 leucocytes/ μL of blood. Thick smears from each village were read by the same experienced technician, under the supervision of a parasitologist. The readings of the two technicians were also compared on the same set of blood samples. Their estimations of parasite detection and parasite density did not differ significantly. Cross-check quality control was done on a randomly selected sample representing 10% of all thick smears.

Determination of haemoglobin

The haemoglobin concentration (g/dL) was done by Hemo-Control EKF Diagnostic analiser that used undiluted blood. Potassium cyanide used in the reference method is replaced by sodium azide. The haemo-drive control uses pits with a short light path containing three reagents: sodium deoxycholate, sodium nitrate and sodium azide. Only 10 µL of capillary blood are needed. When the microbasin is filled by capillary action, it must be adapted to fit into the haemo-control part and fold the tab. The rate of haemoglobin is obtained within 25–60 seconds.

Statistical analyses

Demographic, biological and entomological data were double-entered independently in the Epi database. Parasitological and clinical data were analyzed using the survey command (SPSS16.0). Parasitological data were

analysed separately in terms of prevalence of *Plasmodium falciparum* asexual blood forms, density of *P. falciparum* asexual blood forms in parasite-positive blood thick films. The prevalence of asymptomatic malaria infections was analysed as a binomial response by using a logistic regression model.

To measure the strength of the association between the explanatory factors (use of mosquito nets by children the day before the survey, status of low or high vector resistance in the villages), the prevalence of infection and the prevalence of anemia, the ratio of the coast or odds ratio (OR) was calculated. Allelic frequencies of *Kdr* mutation were compared with GENEPOL software. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Ethical clearance

This study was planned and approved by the Ministry of Health, Benin. The protocol was also reviewed and

Table 2 Results cluster specific phenotype data 2012 and *Kdr* frequencies

Cluster name	Country specific resistance classification	No exposed	No killed 24 hours after 1-hr exposure	Mortality (%)	Samples size (2n)	Frequency (%) <i>Kdr</i>
Banigbé	R+++	123	24	19.51	102	74.5
Kokoumolou	R+++	172	96	55.81	80	63.8
Agbarou	R+++	211	126	59.72	72	65.3
Araromi	R+++	141	89	63.12	98	61.2
Ko-Dogba	R+++	277	181	65.34	124	68.5
Mowodani	R+++	118	86	72.88	24	66.7
Igbo-Abikou	R+++	194	143	73.71	60	76.7
Idena3	R+++	199	147	73.87	126	68.3
Alabansa	R+++	192	142	73.96	100	72.0
Tchaada	R+++	225	167	74.22	98	83.7
Adjozoume	R+++	251	188	74.90	74	66.2
Iwaï	R+++	45	35	77.78	46	63.0
Total (R+++)		2,148	1,424	65.40		69.1
Djohounkolé	R+	257	203	79.00	112	69.6
Kétougbékon	R+	349	278	79.66	58	62.1
Lokossa	R+	327	261	79.82	114	65.8
Itakpako	R+	297	238	80.13	42	54.8
Igbola	R+	196	159	81.12	54	77.8
Ita-soumba	R+	352	290	82.39	48	66.7
Ko-Aïdjedo	R+	302	250	82.78	46	52.2
Zihan	R+	342	287	83.92	70	38.6
Gblo-Gblo	R+	50	42	84.00	40	62.5
Okéola	R+	481	430	89.40	104	74.0
Idena2	R+	651	618	94.93	138	69.6
Kpankoun	R+	50	48	96.00	16	50.0
Daagbe	R+	26	25	96.15	28	60.7
Total (R+)		3,680	3129	85.33		61.8

R+++: high resistance R+: low resistance.

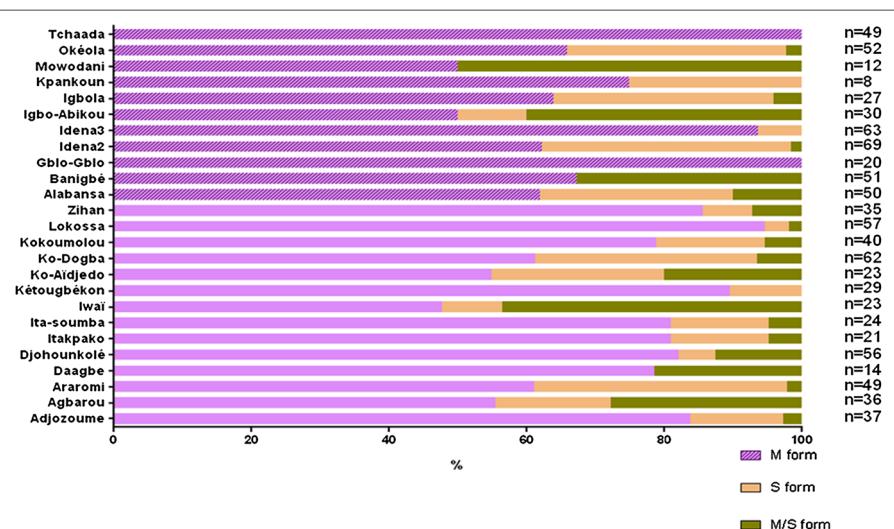


Figure 2 Molecular form of *Anopheles gambiae* collected by cluster.

approved by National Ethics Committee for Health Research at the Ministry of Health, Benin. A briefing note indicating the objectives of the study, the advantages and disadvantages was given to the respondents in order to obtain consent. Confidentiality was respected and questionnaires were anonymous.

Results

Mortality rates, molecular form and knockdown resistance of *Anopheles gambiae*

The observed mortality of vector population exposed to deltamethrin ranged from 19-96% (Table 2). The results do not allow a fair distribution of R+ and R++ areas according to the criteria of departure. Only three of the twenty-five villages positive in the collection of larvae obey the criterion of R++. Thus, in order to standardize the analysis and have two groups of localities based on the level of resistance as discriminatory variable, the median of mortality rate was determined. The median mortality rate was 79% (74.0-83.9) CI 95%. Therefore, 12 localities of high resistance and 13 localities of low resistance were distinguished.

Knock down resistance frequencies was between 38-84% (Table 2). All *An. gambiae* s.l. collected was *An. gambiae sensu stricto* (s.s) (100%). The results of molecular form identification showed that M and S were present in most of the villages (Figure 2). *Anopheles gambiae* s.s. collected from Gblo-gblo and Tchaada villages were only M form. Some hybrids M/S of *An. gambiae* s.s. were also found in several villages (Figure 2). The kdr mutation was found in both M and S molecular form of *An. gambiae* s.s., but their frequencies varied according to villages. The S form was found in very small proportion (Figure 2).

Population description, net use, prevalence of infection, and anaemia

A total of 1,000 children aged six to 59 months from the 25 clusters were tested for *P. falciparum* malaria infection. In each cluster (with low or high resistance), around 40 children were selected. The average age of the children included in the study was 27 months. In the low resistance localities the average age was 26 months against 28 months in high resistance areas (Table 3). Of the households selected in the 25 clusters, 89% had at least one LLIN. 71% of children followed slept under LLIN the night before the survey. In the low resistance area, the proportion of children sleeping under LLIN was 74% against 68% in the high resistance area (Table 3).

The prevalence of malaria infection in children aged under five years in the community was 22.4% (19.9-25.1) (Table 4). This prevalence was 17.3% (14.2-20.9) in areas of high resistance and 27.1% (23.5-31.1) in areas of

Table 3 Characteristics of the children used in the analysis and all children tested in the survey

	Low resistance area (13 clusters)	High resistance area (12 clusters)
Number of children	520	480
Prevalence of malaria (%)	27.1 (23.5-31.1)	17.3 (14.2-20.9)
Average age (months)	26.5 (25.3-27.8)	28.4 (27.3-29.6)
Slept under net (%)	74.1 (70.1-77.6)	68.0 (63.6-71.9)
Mean of haemoglobin rate	9.5 (9.4-9.7)	9.2 (9.1-9.3)

Table 4 Prevalence of *Plasmodium falciparum* in low and high resistance areas

Cluster name	Country specific resistance classification	Number of blood smears	Number of positive blood smears	Prevalence of <i>P. f</i> (%)
Banigbe	R+++	40	10	25.0
Kokoumolou	R+++	40	6	15.0
Agbarou	R+++	40	4	10.0
Araromi	R+++	40	9	22.5
Ko-Dogba	R+++	40	13	32.5
Mowodani	R+++	40	6	15.0
Igbo-Abikou	R+++	40	9	22.5
Idena3	R+++	40	11	27.5
Alabansa	R+++	40	7	17.5
Tchaada	R+++	40	2	05.0
Adjozoume	R+++	40	4	10.0
Iwai	R+++	40	2	05.0
Total (R+++)		480	83	17.3
Djohounkolé	R+	40	6	15.0
Kétougbékon	R+	40	4	10.0
Lokossa	R+	40	13	32.5
Itakpako	R+	40	22	55.0
Igbola	R+	40	15	37.5
Ita-soumba	R+	40	23	57.5
Ko-Aïdjedo	R+	40	9	22.5
Zihan	R+	40	18	45.0
Gblo-Gblo	R+	40	15	37.5
Okéola	R+	40	3	7.5
Idena2	R+	40	5	12.5
Kpankoun	R+	40	5	12.5
Daagbe	R+	40	3	7.5
Total (R+)		520	141	27.1

low resistance ($p = 0.04$). There was more infection to *P. falciparum* in areas that showed higher mortality to deltamethrin. However, the villages taken separately showed no link between the prevalence of *P. falciparum* infection and mortality deltamethrin (Figure 3).

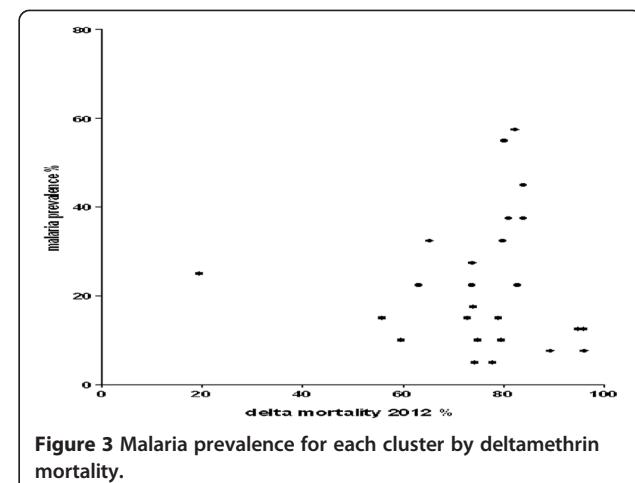


Figure 3 Malaria prevalence for each cluster by deltamethrin mortality.

The mean haemoglobin rate in children was 9.4 g/dl (9.3 -9.5) without variation according to different localities (Table 2). Table 5 describes haemoglobin rates among children aged six to 59 months in areas of high and low resistance. In the 1,000 children assessed, 77% were anaemic. Eight on ten children that were aged six - 30 months against seven on ten of those aged 31–59 months had anaemia (Table 5). The anaemia observed in the six to 30 month old children was significantly higher than in the 31–59 month old children ($p = 0.00$) but no difference associated with resistance areas was observed ($p = 0.35$).

Effect of resistance on LLIN effectiveness

The risk of having malaria is significantly higher for children who did not sleep under LLINs than for children who do in the two areas (Table 6). But the prevalence of malaria was higher among children that used LLINs in areas with low resistance than in areas with high resistance. A similar result was observed with children that did not use LLINs in the areas. The risk of having malaria was significantly reduced ($p < 0.05$) with LLIN use in both low and high resistance areas. The preventive effect of LLINs in high resistance areas was 60% (95% CI: 40–70), and was significantly higher than that observed in low resistance areas ($p < 0.05$).

Table 5 Distribution of children's haemoglobin rate between low and high resistance areas

Age (months)	Haemoglobin rate <11 g/dl		High resistance area	
	Low resistance area		High resistance area	
	Number (%)	Total population	Number (%)	Total population
[6-30] months	244 (80.3)	304	256 (86.5)	296
[31-59] months	146 (67.8)	216	143 (77.7)	184
Total	390 (75.0)	520	399 (83.1)	480

For age: $p = 0.00$ For area resistance: $p = 0.35$.

Table 6 Effect of resistance on LLIN effectiveness by infection prevalence

		Total positive	Total tested by microscopy	Prevalence of P. f (%)	LLIN use	Effect modification of resistance on effectiveness
Low resistance	LLINs	No	46	124	37.1 (36.3-38.0)	1
		Yes	89	356	25.0 (24.6-25.5)	1.8 (1.1-2.8) p = 0.00
High resistance	LLINs	No	46	166	27.7 (27.0-28.4)	1
		Yes	43	354	12.1 (11.8-12.4)	2.8 (1.7-4.5) p = 0.000
						0.4 (0.3 0.6) p = 0.000

Table 7 shows that the use of LLINs reduces the prevalence of anaemia in both low and high insecticide resistance areas. Anaemia was significantly higher in children who did not use LLINs compared to children who used them, in areas of low resistance ($p = 0.02$), whereas in high resistance areas the risk was not significant ($p = 0.67$). The prevalence of anaemia associated with LLIN use was significantly higher in areas with low resistance than in areas with high resistance ($p = 0.000$).

Discussion

The results of LLIN effectiveness in malaria prevention in vector resistance area showed that the resistance of vectors does not reduce the effectiveness of LLINs, but the prevalence of malaria and anaemia was higher in low resistance areas, and was in contradiction with what was expected. *Anopheles gambiae*, the main vector of malaria in Africa, has developed a strong resistance to pyrethroid in southern Benin [25]. This resistance has been observed not only in urban areas and in areas characterized by cotton growing but also in rural areas where traditional farming does not require the use of agricultural insecticides or fertilizers [11,15,26]. The main mechanism of pyrethroid resistance observed in southern Benin is based on the modification of target in the vectors. Contrary to that observed in some African countries, such as Burkina Faso [27], this resistance is high in *An. gambiae* M and

S form. The M form was the predominant population in southern Benin in general, and particularly in this study area. These results confirm those of Yadouléton *et al.* [13] showing that the resistance of malaria vectors to insecticides was growing in Benin.

In order to determine the influence of pyrethroid resistance on LLIN efficacy, the evolution of vector susceptibility in the study area was monitored. Survey results showed that phenotypic resistance varied strongly over time when compared with 2011 data [26]. This variation has led to recommendations for the WHO village classification. Indeed, median value of the deltamethrin mortality was used for clustering of villages of high and low resistance. The median value for mortality in this study was 79%. This suggested that the mortality induced by deltamethrin has decreased. So, vector susceptibility to deltamethrin appears a dynamic phenomenon, which could be influenced either by intra- and extra-parameters, such as climatic conditions, ecological factors, or season.

Kdr mutation is responsible of pyrethroid resistance but detoxification mechanisms are also involved. Until now, the part of each mechanism does not know in the phenotypes observed in this study. *Kdr* results showed that there was a significant difference between the low and high resistance villages in 2012. The frequencies of this mutation are significantly lower in low resistance areas than in high resistance areas. The mutation was

Table 7 Effect of resistance on LLIN effectiveness by prevalence of anaemia

Resistance area	LLIN use	Anaemia +	Anaemia -	Total	Anaemia Prevalence (%)	Odds ratio LLIN no use versus use net	Odds ratio high versus low resistance
Low resistance							
	No	54	19	73	74.0	1	
	Yes	345	62	407	84.8	0.5 (0.3-0.9)	1
Total low resistance		399	81	480	83.1		$p = 0.02$
High resistance	No	85	26	111	76.6	1	
	Yes	305	104	409	74.6	1.1	1.9 (1.3-2.7)
Total high resistance		390	130	520	75.0		
Total		789	211	1,000	78.9		$p = 0.67$
							$p = 0.000$

also found either in the M and S form. This could be explained by a high selection pressure of the *kdr* gene in the field populations of vectors. Therefore, the correlation between phenotypic resistance (susceptibility to deltamethrin) and genotypic resistance does not observe [27]. The metabolic mechanisms involved in pyrethroid resistance are present in Benin [28-31]; complementary studies on these genes should be conducted to address this question.

The LLIN coverage of households in children provenance in this study (88%) and the utilization rate of LLINs by children (71%) were better. Furthermore, no significant difference was observed between the coverage and the usage of LLIN in both localities (R+ and R++). Thus, both arms have been homogeneity and these factors do not affect the analysis of results.

The prevalence of malaria parasitaemia in this study population was 22%, and variations were found between clusters (5.0-57.5). It was lower than the 44.4% prevalence reported in children < five years of age from the malaria indicator survey conducted in the same region in 2010 [32]. These prevalences were similar to those observed by Pond [33] among children living in rural communities distant by 150 km to cities or within the same zone of malaria endemicity. This study showed that in 14 of 20 large cities, all the children living in 75% or more of the clusters were malaria parasite-free. The decrease in the prevalence of malaria parasites may be due to the control measures recently implemented by the Benin Government through the Ministry of Public Health [34]. The measures include a nationwide free distribution of LLINs [10]. The decline in malaria burden attributed to the use of interventions such as LLINs was also reported in malaria-endemic countries, such as Kenya [35].

The prevalence of anaemia in this population of young infants was 78.9%, nearly identical to those rates reported (79%) for the region in the malaria indicator survey conducted in 2010 [31]. The prevalence of anaemia observed in the study is not unexpected as a positive relationship with resistance. The level of haemoglobin (<11 g/dl) used as an indicator of anaemia was not significantly influenced by vector resistance to insecticide. Achidi *et al.* [36] in Cameroun showed that the difference of prevalence of anaemia was not unexpected in the locality. They could potentially reflect the decline of nutritional status.

In this study, LLIN effectiveness in malaria prevention was significantly higher in the resistance area. The prevention of anaemia by the use of LLINs was also higher in areas of high resistance. According to a recent study on malaria transmission in the study area [37], vector density was very high in low resistance areas. These authors noted in low-resistance area a high EIR of 184.5

infected bites /man /6 months against 66.7 infected bites /man /6 months (p <0.001) in the high resistance area. Similarly, the prevalence of malaria infection was 27.1% in low resistance area against 17.3% in high resistance area. However, no significant difference was observed between the prevalence of anaemia in two areas. The high level of transmission obtained in the region should thus lead to a greater number of malaria cases. The results of a recent study [38] suggest that feeding on human hosts whose blood has been depleted due to severe anaemia did not significantly reduce the ability or potential transmission of malaria vectors, and indicates that mosquitoes may be able to exploit the few resources from a low level of haemoglobin rather than one that is normal in order to reproduce. For proper evaluation of the impact of vector resistance to pyrethroids on the effectiveness of LLINs, it would be desirable to have two frankly different areas of susceptibility vectors status: one where the Anopheles was resistant and another one where Anopheles was fully susceptible. In addition, the two areas must have the same ecological characteristics. Unfortunately, the sharp increase in the vectors resistance in southern Benin, has not allowed us to obtain such areas and this is what constitutes the main limitation of this study. Another limitation of this study was the cross-sectional study design. Associations presented could have been confounded by unmeasured factors and therefore causal inferences cannot be drawn. In addition, the temporal relationship between exposure variables (evolution of resistance vectors, the effectiveness of the use LLIN) and outcomes of interest (occurrence of malaria cases and other related factors) cannot be observed. Finally, because this study enrolled participants using convenience sampling and was done in a single geographically defined area, care should be taken in generalizing the results to the other populations.

Conclusion

In the surveyed study area, resistance of malaria vectors seem to date not have affected the impact of LLINs and the use of LLINs was highly associated with reduced malaria prevalence irrespective of resistance. The surprising result of lower prevalence in high resistance areas is likely due to differences in mosquito populations, e.g. larval habitat distribution, productivity and adult density but that there should be further studies to determine the possible causes of such results.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FTT, MCA, AM, DKG, AHO, and IK participated in the coordination of the study, data analysis and manuscript preparation. AAA, AW and DG participated in coordination of the study, data collection and manuscript preparation. VG helped in mapping, manuscript preparation and revision.

OM participated in the coordination of the study and data collection. YS, RO, AS and SC participated in the study design and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to the children who participated in this study as well as their parents and guardians. Funding for the main research trial from which data were used for this analysis was funded by Bill & Melinda Gates Foundation.

The authors express their sincere thanks to the fieldworkers and all those who participated in the study. A special thanks to Abraham MNZAVA, Bruno Aholoukpé, Alioune Adechoubou, Patrick Makoutode, Isabelle Vidjenagnin, Thibaud Legba, Raphael N'guessan, Innocent Djegbe, and Martin Donnelly for their participation.

Author details

¹National Malaria Control Programme, Cotonou, Benin. ²Ministry of Health, Cotonou, Benin. ³Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey Calavi, Calavi, Benin. ⁴World Health Organization, Cotonou, Benin. ⁵Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Calavi, Benin. ⁶Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ⁷Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC, UM1-CNRS 5290-IRD 224, Cotonou, Benin. ⁸Department of Infectious Disease Epidemiology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK.

Received: 16 December 2013 Accepted: 23 February 2014

Published: 1 March 2014

References

- WHO: *World Malaria Report*. Geneva: World Health Organization; 2005. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241593199/en/>.
- Lengeler C: **Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria.** *Cochrane Database Syst Rev Online* 2004, **2**:CD000363.
- Hawley WA, Phillips-Howard PA, Kuile FOT, Terlouw DJ, Vulule JM, Ombok M, Nahalen BL, Gimnig JE, Kariuki SK, Kolczak MS, Hightower AW: **Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**(4 suppl):121–127.
- Beer N, Ali AS, de Savigny D, Al-mafazy A-w H, Ramsan M, Abass AK, Omari RS, Björkman A, Källander K: **System effectiveness of a targeted free mass distribution of long lasting insecticidal nets in Zanzibar Tanzania.** *Malar J* 2010, **9**:173.
- Grabowsky M, Farrell N, Hawley W, Chimumbwa J, Hoyer S, Wolkon A, Selanikio J: **Integrating insecticide-treated bednets into a measles vaccination campaign achieves high, rapid and equitable coverage with direct and voucher-based methods.** *Trop Med Int Health* 2005, **10**:1151–1160.
- Teklehaimanot A, Sachs JD, Curtis C: **Malaria control needs mass distribution of insecticidal bednets.** *Lancet* 2007, **369**:2143–2146.
- WHO: *Malaria Vector Control and Personal Protection Report of a WHO Study Group*. Geneva: World Health Organization; 2006.
- Moiroux N, Boussari O, Djénontin A, Damien G, Cottrell G, Henry M-C, Guis H, Corbel V: **Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin West Africa.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e30558.
- Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djénontin A, Chandre F, Rogier C, Moiroux N, Chabi J, Banganga B, Padonou GG, Henry M-C: **Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial.** *Lancet Infect Dis* 2012, **12**:617–626.
- Tokponnon FT, Aholoukpé B, Denon EY, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Gazard DK, Akogbeto MC: **Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin.** *Parasit Vectors* 2013, **6**:265.
- Djogbénou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, Weill M, Chandre F: **Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex.** *Acta Trop* 2010, **114**:116–122.
- Djègbé 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.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Bangana S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC: **Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin.** *Malar J* 2010, **9**:83.
- Djénontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudéonkpo S, Corbel V, Akogbeto 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.
- Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, Dabiré R, Aikpon R, Boko M, Glitho I, Akogbeto M: **Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:60.
- N'guessan R, Corbel V, Bonnet J, Yates A, Asidi A, Boko P, Odjo A, Akogbeto 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.
- Asidi A, N'guessan R, Akogbeto M, Curtis C, Rowland M: **Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes, Benin.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:1101–1106.
- Gnanguenon V, Azondekon R, Oke-Agbo F, Sovi A, Ossè R, Padonou G, Aikpon R, Akogbeto MC: **Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets.** *BMC Public Health* 2013, **13**:751.
- Taylor PJ, Hurd H: **The influence of host haematocrit on the blood feeding success of *Anopheles stephensi*: implications for enhanced malaria transmission.** *Parasitology* 2001, **122**:491–496.
- Ferguson HM, Rivero A, Read AF: **The influence of malaria parasite genetic diversity and anaemia on mosquito feeding and fecundity.** *Parasitology* 2003, **127**:9–19.
- WHO: *Report of the WHO Informal Consultation. Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. Geneva: World Health Organization: Parasitic Diseases and Vector Control (PVC)/Communicable Disease Control, Prevention and Eradication (CPE); 1998:43. WHO/CPC/MAL/98.12.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH: **Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520–529.
- Favia G, Della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N, Touré YT, 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.
- Lynd A, Ranson H, McCall PJ, Randle NP, Black WC, Walker ED, Donnelly MJ: **A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*.** *Malar J* 2005, **4**:16.
- Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo WM, Kerah-Hinzoumbe C, Yangalbé-Kalonné E, Sagnon N, Simard F, Coetzee M: **Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem.** *Malar J* 2009, **8**:299.
- Akogbeto MC, Djouaka R, Noukpo H: **Use of agricultural insecticides in Benin (in French).** *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**:400–405.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, Hougard JM: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**(6):617–622.
- Ministère de la santé/PNLP/CREC: *Rapport Benin Première Année d'étude, Projet Gates/OMS. Impacts de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des moustiques imprégnées au Bénin.* Cotonou; 2011:64.
- Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, **9**:538.
- Djouaka R, Irving H, Turuk Z, Wondji CS: **Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e27760.
- Müller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, Paine MJ, Donnelly MJ:

- Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 2008, 4(11):e1000286.
32. PNLP - Africare Benin -CRS Benin: *Evaluation finale du projet d'appui à la lutte contre le paludisme*. Cotonou; 2011:42.
33. Pond BS: Malaria indicator surveys demonstrate a markedly lower prevalence of malaria in large cities of sub-Saharan Africa. *Malar J* 2013, 12:313.
34. PNLP: *Campagne de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action aux ménages du Bénin*. Cotonou: Ministère de la Santé; 2012:11.
35. Okiro EA, Snow RW: The relationship between reported fever and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Malar J* 2010, 9:99.
36. Achidi EA, Apinjoh TO, Anchang-Kimbi JK, Mugri RN, Ngwai AN, Yafi CN: Severe and uncomplicated falciparum malaria in children from three regions and three ethnic groups in Cameroon: prospective study. *Malar J* 2012, 11:215.
37. Sovi A, Azondékon R, Aïkpon RY, Govoéchan R, Tokponnon F, Agossa F, Salako AS, Oké-Agbo F, Aholoukpé B, Okè M, Gbénou D, Massougbedji A, Akogbétou M: Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasit Vectors* 2013, 6:319.
38. Emami SN, Ranford-Cartwright LC, Ferguson HM: The impact of low erythrocyte density in human blood on the fitness and energetic reserves of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar J* 2013, 12:45.

doi:10.1186/1475-2875-13-76

Cite this article as: Tokponnon et al.: Impact of long-lasting, insecticidal nets on anaemia and prevalence of *Plasmodium falciparum* among children under five years in areas with highly resistant malaria vectors. *Malaria Journal* 2014 13:76.

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



RESEARCH

Open Access

Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin

Arthur Sovi^{1,2*}, Renaud Govoéchan^{1,2}, Filémon Tokponnon^{2,3}, Hermine Hounkonnou¹, Rock Aïkpon^{1,2}, Fiacre Agossa^{1,2}, Virgile Gnanguenon^{1,2}, Albert S Salako¹, Christian Agossou⁶, Razaki Ossè^{1,2}, Mariam Okè³, Dina Gbénou⁴, Achille Massougbedji⁵ and Martin Akogbéto^{1,2}

Abstract

Background: The goal of the study is to investigate if local agricultural practices have an impact on malaria transmission in four villages located in the same geographical area within a radius of 15 kilometers. Among the villages, one (Itassoumba) is characterized by the presence of a large market garden and fishpond basins, the three others (Itakpako, Djohounkollé and Ko-koumolou) are characterized by traditional food-producing agriculture.

Methods: Malaria transmission was evaluated using human-landing catches, both indoors and outdoors, two nights per month for 12 months. Field collected females *An. gambiae* s.l. were exposed for 1 hour to 0.75% permethrin and 0.05% deltamethrin using WHO insecticide susceptibility test kits and procedures. The presence of the *kdr* mutation was analyzed by PCR.

Results: *Anopheles gambiae* s.s form M (93.65%), was identified as the main malaria vector. Its susceptibility level to pyrethroids was the same ($p > 0.05$) in all villages. *kdr* mutation frequencies are 81.08 in Itakpako, 85 in Itassoumba, 79.73 in Djohounkollé and 86.84 in Ko-Koumolou ($p = 0.63$). The entomological inoculation rate ranged from 9.62 to 21.65 infected bites of *An. gambiae* per human per year in Djohounkollé, Itakpako and Ko-Koumolou against 1159.62 in Itassoumba ($p < 0.0001$).

Conclusion: The level of resistance of *An. gambiae* to pyrethroids was the same in the four villages. The heterogeneous character of malaria epidemiology was confirmed. The creation of fishponds basins and the development of market-gardening activities increased drastically the malaria transmission in Itassoumba.

Keywords: *An. gambiae*, Transmission, Resistance, Fishpond basins, Market-garden

Background

In Africa, malaria transmission varies according to ecological features. The relations which exist between the host, the parasite and the vector vary according to environmental conditions. This creates various epidemiological features. Carnevale *et al.* [1], Mouchet *et al.* [2], Fontenille *et al.* [3] described three areas of malaria transmission in Africa: the area with stable, intense and permanent malaria transmission, the area with unstable malaria and episodic transmission and the area with intermediate stability with seasonal recrudescence transmission. But within these

areas, the transmission is not univocal. Heterogeneous biotopes are often announced [4]. The malaria transmission is thus an environmental problem. Different features in the transmission are recognized today: urban malaria, coastal lagoon malaria, malaria of the rice cultivation areas, malaria in altitude area, malaria in dams and forest areas [4-7].

In the southern Sahara countries, the agricultural policy is more and more oriented towards the creation of small dams in order to ensure the food safety of the populations. The increase in population in sub-Saharan Africa and the challenges in agriculture for several decades leads to the development of hydraulic installation, particularly irrigated rice growing areas, market gardening [5] and fish breeding. However, if agricultural dams increase the production of cereals and market-gardening products, they also have a major effect on the endemicity of malaria, because of the

* Correspondence: sart52005@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou 06 BP 2604, Benin

²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Cotonou 01 BP 4521, Bénin

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

creation of mosquito breeding sites suitable for the development of the earlier ecological stages of malaria vectors [8]. Moreover, the works of Manga et al. [9] in Cameroun, Klinkenberg et al. [10] in Ghana and Yadouléton et al. [11] in Benin showed that market-gardening sites are also an area suitable for the development of mosquito larvae. This is explained by the pockets of water constantly maintained by the gardeners for watering their plants that form permanent breeding sites for *Anopheles* larvae. Moreover, Yadouléton et al. [11] showed that malaria transmission is higher in habitation close to market-gardening sites compared to those which are distant. The rice fields, for example, generally cause the mosquitoes proliferation, and constitute an environmental modification model of which entomological impact is variable depending on the local situation and the malaria stability [12]. In addition, several authors have reported that, the pyrethroids use in agricultural areas, especially, in the market-gardening areas is a known practice [13-15]. However, according to Akogbéto et al. [16], several mosquito species, in particular *An. gambiae*, lays their eggs in breeding sites located in the cultivated areas and are likely to be exposed to pyrethroids during the treatments against agricultural pests. According to these same authors, residues of pyrethroids could be found in the soil and could exert a selection pressure on mosquito populations during their development cycle. It is therefore possible that the different agricultural practices implemented have an impact on the malaria vectors resistance status as well on the transmission of the parasites responsible for this disease.

The current study aims to investigate malaria transmission in four villages (Itassoumba, Ko-Koumolou, Djohounkollé and Itakpako) located within a radius of 15 kilometers in the rural area of Benin. Among the four villages, Itassoumba is characterized by a particular land use with the presence of fish breeding sites with a large market garden, contrary to the other three villages where only the culture of cultivating cereals and food stuffs is practiced. In 2011 and 2012, mosquitoes catches were carried out in the four villages. The entomological indicators recorded in Itassoumba were compared to those of the other three villages.

Methods

Study area

This study was carried out from July 2011 to June 2012 (12 months) in the Plateau's region, located in Southeastern Benin, West Africa, and more precisely in four villages of Ifangni and Sakété districts. Itakpako, Itassoumba and Ko-Koumolou are in Ifangni district, and Djohounkollé in Sakété district (Figure 1). This region has a little uneven relief with the presence of some depressions. The climate is guinean with two dry seasons and two rainy seasons which alternate during the year: a long rainy season from March to July, a short dry season during August, then a

short rainy season from September to November and finally, a long dry season from December to February. The Plateau region holds a lot of swamps used for market gardening and the cultivation of different species of nursery trees. At the country scale, malaria is endemic and stable with seasonal upsurges in the Plateau region. The number of malaria cases recorded there in 2011 and 2012 were 40512 and 33745 respectively [17,18]. At the national level 7.4% and 6% of all malaria cases were recorded in this region in 2011 and 2012. In 2011, 43 deaths were recorded in the Plateau region against 60 deaths in 2012 [17,18]. A cross sectional investigation carried out on children under five years in June 2012 showed that malaria prevalence was 57.5%, 15% and 15% respectively at Itassoumba, Ko-Koumolou, Djohounkollé (Tokponnon, unpublished observation).

In 2011, a large scale distribution of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) was carried out in this region so that the individual coverage rate of mosquito nets in 2012 was 91.39% in Itassoumba, 98.78% in Itakpako, 106.73% in Ko-Koumolou and 93.78% in Djohounkollé (Sovi, unpublished observation). Itassoumba is a village located near a large market-gardening site where there are several fishponds (Figure 2) contrary to Itakpako, Ko-Koumolou and Djohounkollé where only the culture of cultivating cereals and food stuffs is practiced. The distance between the breeding sites and households varies generally between 0.5 and 2.1 km in the four villages.

The market-gardening and fishponds field of Itassoumba covers approximately an area of 4 hectares. In this perimeter, we found 128 basins where breeding of mainly tilapia and to a lesser extent catfishes nourished with various types of provender (Coppens, Legouessant, Multifeed or Aquafeed) used according to the development stage of alevins or fish. The two types of fishes are bred in different basins and the provender is often thrown on the surface of the water to feed them. One fish breeding site is generally maintained by one person. As time goes on, new basins are dug in order to increase fish production on the site because of the unceasingly increasing requests from the market. The breeding of fishes is done throughout the year and the sale of these fishes is done at the markets in the communities of Ifangni and the close localities of Nigeria. The production of vegetables is seasonal in the market gardens of Itassoumba from December to February corresponding to the period of the dry season where vegetables are generally not available on the market. Vegetables are produced on plots and watering is done with water from fishponds.

Sampling of mosquito populations

Human landing catch

To measure the malaria transmission in each village, we collected *Anopheles*. This gathering method of *Anopheles* enabled us to evaluate the biting rate and the frequency of infected biting for each village. In each village, for one

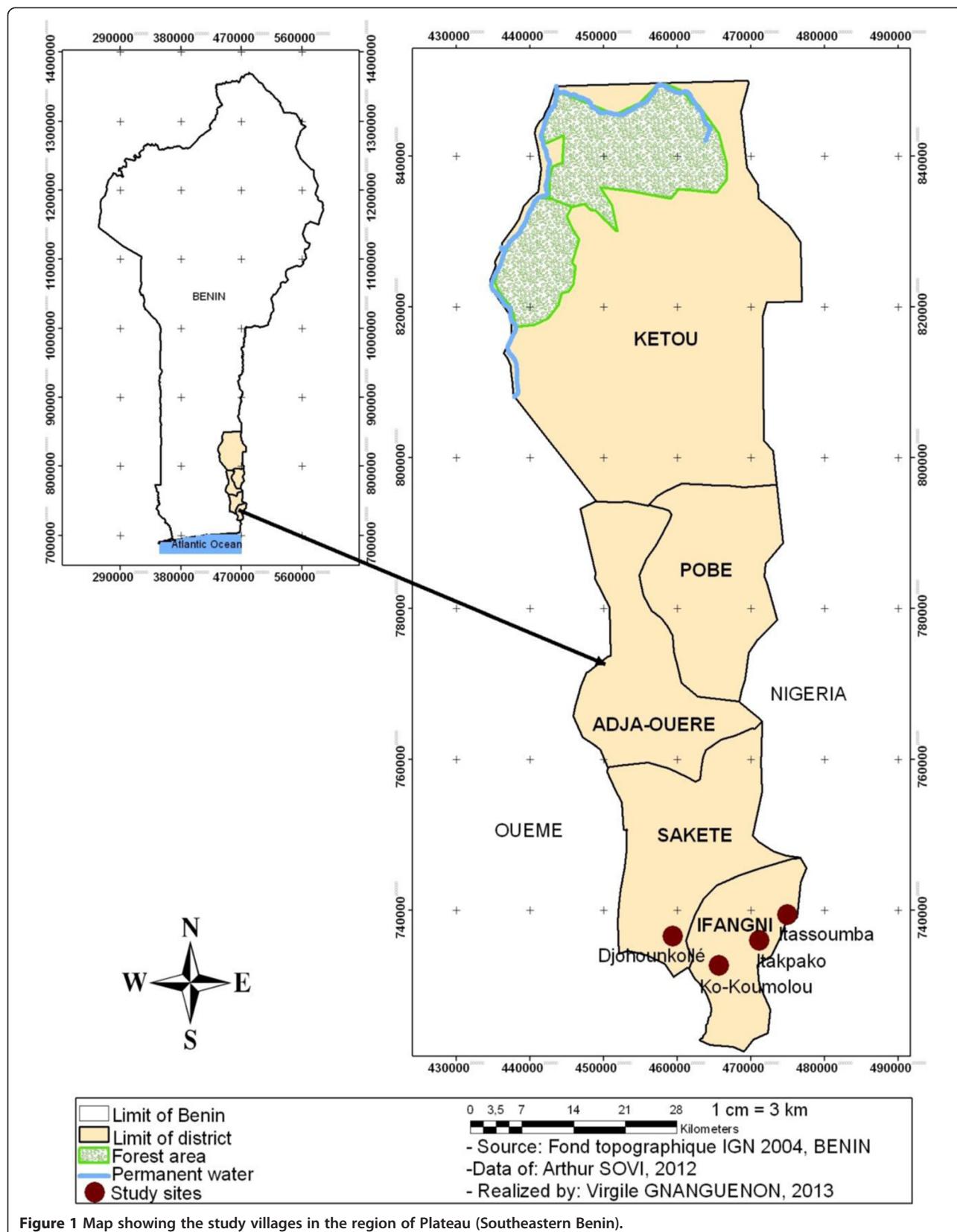


Figure 1 Map showing the study villages in the region of Plateau (Southeastern Benin).



Figure 2 Fishponds basins and market garden site of Itassoumba.

capture session, 4 human volunteers were used as bait for both indoor and outdoor mosquito collections in 2 houses, according to the human landing catch technique. Two successive capture sessions were carried out per month during 10 months in each village totaling 8 man night catches per month per village, then 80 man night catches per 10 months per village. Another collections of mosquitoes were carried out on 2 nights (1 in December 2011 and 1 in January 2012) totaling 8 man night catches per 2 months per village. These catches were then conducted for a period of 12 months totaling 88 man night catches per year per village. Mosquito collections were made from 9 pm to 05 am the following morning.

The captured mosquitoes were identified the next morning using the morphological identification key of Gillies & de Meillon [19]. The head and thorax of each *Anopheles* is preserved on silicagel for infectivity determination using circumsporozoite protein (CSP) ELISA technique for *P. falciparum* detection. From mosquitoes collected and the ELISA test results, we determined the human biting rate, the sporozoitic index and the entomological inoculation rate (EIR) for each village.

Collection of *An. gambiae* larvae

Larvae and pupae of *An. gambiae* were collected by the method of "dipping". These larvae and pupae were kept separately in labeled bottles and were reared in the insectarium of Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) until they emerged into adults mosquitoes. Females aged from 2 to 5 days were used for WHO susceptibility bioassay under laboratory conditions ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $80\% \pm 4\%$ relative humidity).

Susceptibility of *An. gambiae* to insecticides

WHO susceptibility bioassays were performed using unfed females of *An. gambiae* s.l., aged from 2 to 5 days. These bioassays were carried out with impregnated papers of deltamethrin (0.05%) and permethrin (0.75%). 25 females were introduced into treatment tube for 60 minutes. The number of knocked down mosquitoes were recorded every ten minutes during the period of exposure. Field collected

mosquitoes exposed to non-impregnated papers were used as control. After the 60 minutes of exposure, the mosquitoes are transferred into observation tubes and were fed with 10% honey solution then maintained under observation for 24 hours. At the end of the observation period, mortality rate was calculated. According to WHO [20], a mortality rate higher than 97% means that the population of mosquito tested is susceptible, a mortality rate between 90 and 97% means a suspicion of resistance and a mortality rate lower than 90% means that the mosquito population tested is resistant. After the tests, the dead and alive mosquitoes are preserved separately on silicagel and are stored at -20°C for molecular characterization by PCR.

Infection and molecular characterization of the populations of *An. gambiae* by PCR: species, molecular forms and *kdr* Leu-phe mutation

The head and thorax of each *Anopheles* captured and preserved on silicagel were used for the detection of infection by CSP ELISA method [21,22]. Approximately 30 to 43 females of *An. gambiae* of each village resulting from the susceptibility tests performed with deltamethrin were analyzed by PCR. The species of *An. gambiae* s.l. complex and the molecular forms of *An. gambiae* s.s were identified according to the protocols described by Scott et al. [23] and Favia et al. [24]. The *kdr* mutation was characterized according to the protocol of Martinez-Torrez et al. [25].

Statistical analysis

The biting rate was calculated as the ratio of the number of mosquitoes captured over the number of collectors per night. The infection rate of mosquitoes was evaluated by dividing the number of mosquitoes that were positive for CSP ELISA test over the total number of mosquitoes tested. The EIR is defined as being the number of infective bites received by human per unit time and was evaluated using the product of the biting rate and the sporozoitic index.

To compare the variability of *An. gambiae* human biting rate (HBR) and the EIR between the villages, we used the balanced regression of Poisson followed by an analysis of the deviance using the ratio test of probability. For

the variability of the infectivity rate and frequencies of *kdr* between the villages, we used the comparison of the proportions test of Chi². All these analyses were carried out with the Software R 2.14.1 [26].

Ethical clearance

This study was approved by the National Ethic Committee of Health Research of Benin, the Ministry of Health and the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC). The volunteer mosquito collectors gave their consent before participating in the study. They were vaccinated against yellow fever and treated each time against malaria based on the Rapid Diagnostic Test of *P. falciparum*.

Results

Diversity of culicidae

A total of 5230 mosquitoes belonging to 13 species were collected during the 12 months of the study. The distribution of the various species per village is presented in Table 1.

Out of the total mosquitoes caught, 78.97% (4130/5230) were *Anopheles* genus, 12.89% (674/5230) of *Aedes*, 5.83% (305/5230) of *Culex* and 2.32% (121/5230) of *Mansonia* (Table 1). These four mosquito genera were present in each of the four villages but in variable proportions. The greatest specific diversity was observed within the genus *Culex* with five species (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nebulosus*, *Cx. decens*, *Cx. annulioris* and *Cx. tigripes*), followed by the genus *Anopheles* with four species (*An. gambiae*, *An. ziemanni*, *An. pharoensis* and *An. coustani*).

An. gambiae was the most abundant species in all the four villages. It accounted for 78.64% (4113/5230) of the total collected mosquitoes.

For the same study period, 97.11% (3994/4113) of *An. gambiae* mosquitoes collected were captured in the market-gardening and fishponds village of Itassoumba against only 1.41% (58/4113) in Djohounkollé, 1.04% (43/4113) in Itakpako, and 0.44% (18/4113) in Ko-Koumolou. In Djohounkollé, 73.31% (607/828) of the mosquitoes caught were *Aedes vittatus*.

In addition to the *Anopheles* abundance in Itassoumba, *Mansonia africana* was also present and accounts for 1.80% (75/4176) of sampled mosquitoes. The presence of this species is probably due to the presence of swamps in the village. Globally, the land use in Itassoumba affected *Anopheline* densities (n = 3999) but not *Culicine* densities (n = 177).

Infectivity of *An. gambiae*

Table 2 shows the number of mosquitoes analyzed by CSP ELISA and the number of mosquitoes found positive each month. The monthly variation of the infection rate of the mosquitoes during the study period in each village is indicated in the same table. Given the weak number of *An. gambiae* mosquitoes collected during certain months in the majority of the villages, we cumulated our samples over the entire study period to get a higher number of mosquitoes to test. The mean annual sporozoitic index has been 0.06 in Itakpako (2 head-thoraxes positive over 33 tested); 0.07 in Itassoumba (111 positive head-thoraxes over 1519 tested); 0.04 (2 positive head-thoraxes over 52 tested) in Djohounkollé and 0.29 (positive head-thoraxes over 17 tested) in Ko-Koumolou (Table 2). The index is similar in the villages of Itakpako, Itassoumba and Djohounkollé (p = 0.34). A significant difference was obtained between the sporozoitic index recorded in Ko-Koumolou and those

Table 1 Diversity of mosquitoes in the four villages from July 2011 to June 2012

Species	Villages				Total/genus	Genus (%)
	Itakpako	Itassoumba	Djohounkollé	Ko-Koumolou		
<i>Anopheles gambiae</i>	43	3994	58	18	4130	78.97
<i>Anopheles pharoensis</i>	6	2	2	4		
<i>Anopheles ziemanni</i>	0	2	0	0		
<i>Anopheles coustani</i>	0	1	0	0		
<i>Aedes aegypti</i>	3	9	8	7	674	12.89
<i>Aedes vittatus</i>	0	0	607	4		
<i>Aedes palpalis</i>	8	9	13	6		
<i>Culex quinquefasciatus</i>	31	26	97	21	305	5.83
<i>Culex decens</i>	3	4	4	6		
<i>Culex nebulosus</i>	17	54	16	18		
<i>Culex tigripes</i>	0	0	2	1		
<i>Culex annulioris</i>	0	0	5	0		
<i>Mansonia africana</i>	14	75	16	16	121	2.31
TOTAL	125	4176	828	101	5230	100

Table 2 Monthly variation of sporozoitic index from July 2011 to July 2012

Villages		July-11	Aug-11	Sept-11	Oct-11	Nov-11	Dec-11	Jan-12	Feb-12	Mar-12	Apr-12	May-12	June-12	Total (1 year)	CI (95%)
Itakpako	Thorax	5	1	0	1	2	0	0	0	0	0	3	21	33	
	Thorax ⁺	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
	S	0	0	-	1	0	-	-	-	-	-	-	0.05	0.06^a	[0.01-0.20]
Itassoumba	Thorax	47	25	22	78	112	41	222	290	202	160	150	170	1519	
	Thorax ⁺	0	11	2	12	10	3	12	15	24	6	8	8	111	
	S	0	0.44	0.09	0.15	0.09	0.07	0.05	0.05	0.12	0.04	0.05	0.05	0.07^a	[0.06-0.09]
Djohounkollé	Thorax	2	1	0	4	3	0	0	0	0	1	12	29	52	
	Thorax ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	
	S	0	0	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0.07	0.04^{ac}	[0.00-0.13]
Ko-Koumolou	Thorax	7	1	1	1	4	0	0	0	0	1	1	1	17	
	Thorax ⁺	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	5	
	S	0.43	0	0	0	0.25	-	-	-	-	0	0	1	0.29^c	[0.10-0.56]

S: sporozoitic index; CI: confidence interval;^{a, c, ac}Values with the same superscript do not differ significantly ($p > 0.05$), ⁺: positive.

obtained in Itakpako and Itassoumba ($p < 0.05$). These results show that, the infection rate of *An. gambiae* is the same in the villages except in Ko-Koumolou where it is higher, but the ELISA test was performed on only 17 mosquitoes.

Biting and entomological inoculation rates

During the twelve months covered by the study, *An. gambiae* was particularly aggressive in Itassoumba compared to the three other villages ($p < 0.05$). In Itassoumba, a man received an average of 16566.02 bites per year against only 178.35 in Itakpako, 240.56 in Djohounkollé and 74.66 in Ko-Koumolou for the same period (Table 3). A significant difference is observed between the biting rates obtained in the four villages ($P < 0.05$). As a result, the ratio is one bite of *An. gambiae* per man per year in each of the three villages (Itakpako, Djohounkollé and Ko-Koumolou) located far from the market-gardening and fishponds area against 100 bites per man per year in Itassoumba.

Various EIR of *An. gambiae* were recorded each month in the four villages. Except in July 2011, the EIR was very high in Itassoumba compared to the other three villages ($p < 0.05$). In July 2011, no mosquito was found infected in Itassoumba so a null EIR was recorded. After the 12 months covered by the study, The EIR varied from one village to the other. In Itassoumba, a man received an average of 1159.62 infective bites of *An. gambiae* against only 9.62 in Djohounkollé, 10.70 in Itakpako and 21.65 in Ko-Koumolou for the same period ($p < 0.0001$) (Table 3).

Susceptibility of *An. gambiae* to deltamethrin and permethrin

The mortality rates in the control tubes were null. The induced mortality rates of the females of *An. gambiae* by permethrin was 66.67% (58/87), 62.50% (50/80), 76.67% (23/30) and 84.38% (27/32) respectively in Itakpako, Itassoumba, Djohounkollé and Ko-Koumolou (Figure 3). A strong resistance of the *An. gambiae* population to permethrin was thus observed in all the villages. No significant difference was observed between the mortality rates ($p = 0.11$).

On the other side, the resistance level to deltamethrin was not the same in all the villages. In Ko-Koumolou, the populations of *An. gambiae* were susceptible to deltamethrin [100% mortality rate (76/76)]. Suspected resistance was observed in Djohounkollé [93.48% mortality rate (43/46)]. In Itassoumba and Itakpako, the population of *An. gambiae* was resistant to deltamethrin with respective mortality rates of 89.39% (59/66) and 88.64% (78/88) (Figure 3).

As shown above, *An. gambiae* has developed a strong resistance to permethrin in the four villages. Deltamethrin showed a gradient of resistance levels. Considering the two insecticides tested, the populations of *An. gambiae* collected in Itassoumba and Itakpako seem more resistant.

Frequencies of the *kdr* mutation in molecular forms and in dead and alive *An. gambiae* to deltamethrin

A total of 148 *Anopheles* resulting from the susceptibility tests were analyzed by PCR for the species, molecular forms and *kdr* mutation detection. In the four villages, the PCR revealed only the presence of *An. gambiae* s.s. with the two molecular M and S forms, but with the dominance of the M molecular form (M: 93.65%; S: 6.35%). The presence of the *kdr* mutation was also noted. This mutation was observed in the two molecular forms but at a variable frequency. The relative frequency of the forms is recorded in Table 4.

As shown by the results, the *kdr* frequency is similar in dead and alive *An. gambiae* mosquitoes in Itakpako, Itassoumba and Djohounkollé ($p > 0.05$). Moreover, the frequency of the *kdr* mutation is high and similar in all the villages: 86.84% in Ko-Koumolou; 81.08% in Itakpako, 79.73% in Djohounkollé and 85% in Itassoumba ($p = 0.63$).

Discussion

Our study revealed the presence of 13 mosquito species in the study areas. This result is similar to that of Huttel [27] who obtained 14 species in Southern Benin with the same sampling technique. In Djohounkollé, we collected a large number of *Aedes vittatus* compared to *Culex* and *Mansonia*. This strong presence of *Aedes vittatus* in this village surprised us because it is a mosquito that is mainly found in hilly areas; this is not the case of Djohounkollé. Indeed, these mosquitoes usually lay their eggs in standing water in the hollows of rocks [28]. However, after our investigations in the village, we noticed a strong presence of larvae and pupae of this mosquito in open and plaster tanks containing rainwater. This water is used for the traditional extraction of palm oil during the short dry season (period of harvest palm nuts). The similarity of these tanks with hollow rocks, may be why *Aedes vittatus* females prefer these tanks for oviposition.

The ecological characteristics of Itassoumba larval habitats resulting from the land use affect the density of anophelines. Indeed, the breeding sites resulting from the production of vegetables generally contain clean water favorable to the development of *Anopheles* larvae. Due to the nature of the soil, the water seeps quickly, but it is renewed when watering. The possibility that the pollution by accumulation of organic products is very low. Thus, the scarcity of polluted breeding sites is not conducive to the development of culicines larvae. In addition, fishponds also contain clean water regularly renewed to prevent their pollution by accumulation of organic matters that could be detrimental to fishes. This opportunity facilitates the development of anopheline larvae in particular *An. gambiae* to the detriment of culicine larvae in Itassoumba. This does not exist in the other three villages.

An. gambiae s.s. is the main vector involved in malaria transmission in the study localities. The vectorial role of

Table 3 Monthly variation of human biting rate and entomological inoculation rate in four villages from July 2011 to June 2012

Villages	Parameters	July-11	Aug-11	Sept-11	Oct-11	Nov-11	Dec-11	Jan-12	Féb-12	Mar-12	Apr-12	May-12	June-12	Total (1 year)
Itakpako	Total Vect	7	5	1	1	3	0	0	0	0	0	3	23	43
	Man night	8	8	8	8	8	4	4	8	8	8	8	8	88
	HBR	0.88	0.63	0.13	0.13	0.38	0	0	0	0	0	0.38	2.88	178.35^a
	S	0	0	-	1	0	-	-	-	-	-	-	0,05	0,06
	EIR	0	0	-	0,13	0	-	-	-	-	-	-	0,14	10,70^a
	CI	[0–0.06]	[0–0.31]	-	[0–0.31]	[0–0.15]	-	-	-	-	-	-	[0.09–0.20]	[7.3–14.6]
Itassoumba	Total Vect	298	239	134	171	477	136	223	524	319	500	510	463	3994
	Man night	8	8	8	8	8	4	4	8	8	8	8	8	88
	HBR	37.25	29.88	16.75	21.38	59.62	34	55.75	65.50	39.88	62.50	63.75	57.88	16566.02^b
	S	0	0.44	0.09	0.15	0.09	0.07	0.05	0.05	0.12	0.04	0.05	0.05	0.07
	EIR	0	13.14	1.51	3.21	5.36	2.38	2.79	3.27	4.79	2.50	3.19	2.89	1159.62^b
	CI	[0–0.01]	[12.65–13.65]	[1.35–1.71]	[3.15–3.43]	[5.17–5.48]	[2.26–2.74]	[2.70–03.13]	[3.19–3.46]	[4.63–4.84]	[2.26–2.43]	[2.99–3.51]	[2.64–2.94]	[1157.15–1160.45]
Djohounkollé	Total Vect	3	3	0	6	4	0	0	0	0	1	12	29	58
	Man night	8	8	8	8	8	4	4	8	8	8	8	8	88
	HBR	0.38	0.38	0	0.75	0.50	0	0	0	0	0.13	1.5	3.63	240.56^c
	S	0	0	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0.07	0.04
	EIR	0	0	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0.25	9.62^c
	CI	[0–0.15]	[0–0.31]	-	[0–0.08]	[0–0.10]	-	-	-	-	[0–0.31]	[0–0.03]	[0.19–0.32]	[07.30–12.41]
Ko-Koumolou	Total Vect	7	1	1	1	4	0	0	0	0	1	1	2	18
	Man night	8	8	8	8	8	4	4	8	8	8	8	8	88
	HBR	0.88	0.13	0.13	0.13	0.50	0	0	0	0	0.13	0.13	0.25	74.66^d
	S	0.43	0	0	0	0.25	-	-	-	-	0	0	1	0,29
	EIR	0.38	0	0	0	0.13	-	-	-	-	0	0	0.25	21.65^d
	CI	[0.24–0.56]	[0–0.31]	[0–0.31]	[0–0.31]	[0.04–0.30]	-	-	-	-	[0–0.31]	[0–0.31]	[0.05–0.80]	[18.25–25.55]

Total Vect: total of vectors; HBR: human biting rate; EIR: entomological inoculation rate;^{a, b, c, d}The same parameters with different superscript are statistically different ($p < 0.05$).

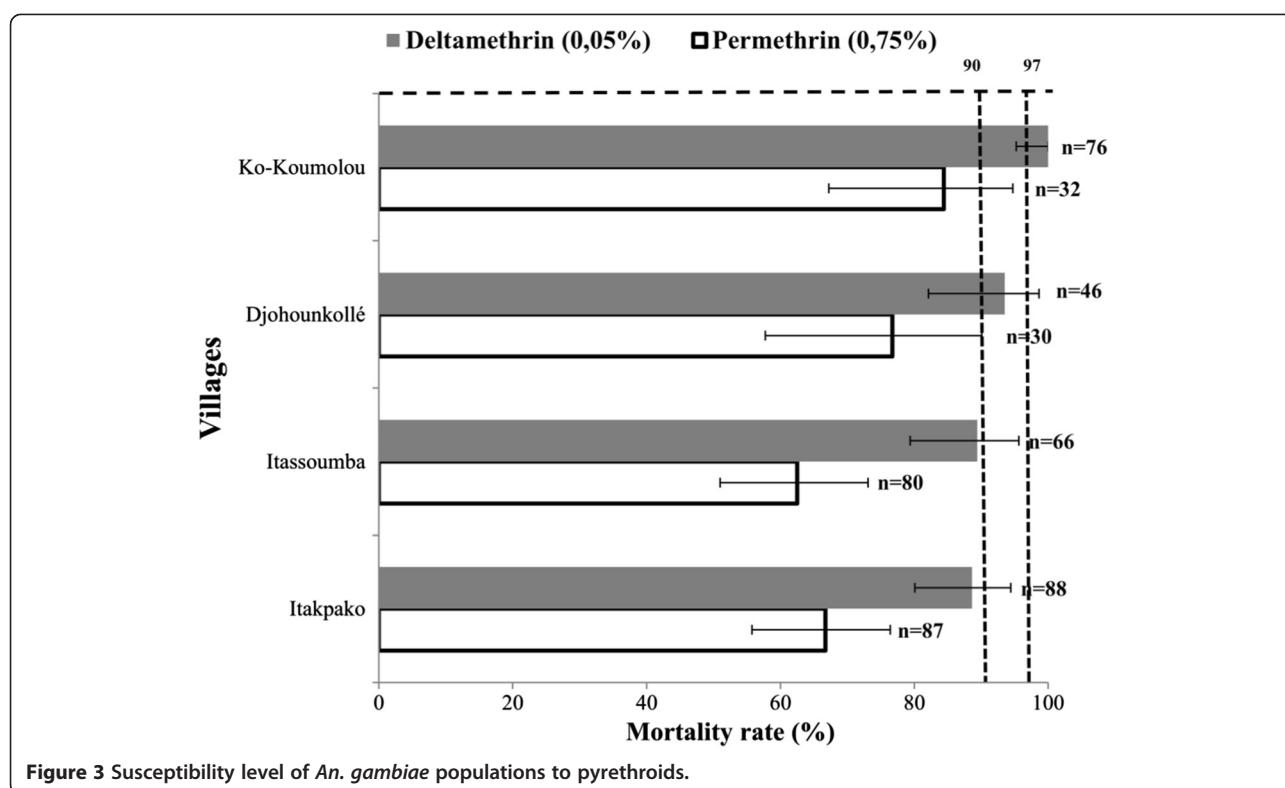


Figure 3 Susceptibility level of *An. gambiae* populations to pyrethroids.

An. gambiae in malaria transmission in Benin is reported in several works [4-15]. The predominance of the M molecular form of *An. gambiae* observed in the four villages is explained by the fact that, this form often finds favorable conditions for its development in Southern Benin. According to Coluzzi *et al.* [29], the M and S molecular forms of *An. gambiae* have variable distribution according to the ecological habitat and

comprise five chromosomal forms in West Africa. The forms are Mofti, Savannah, Bissau, Forest and Bamako. Environmental analyzes showed that altitude, precipitation and temperature are the significant factors contributing in the spatial distribution of these forms [30]. Precipitation is a significant factor implicated in the development of the M and S molecular forms. The M molecular form of *An. gambiae* is described to be favorable to the wetlands

Table 4 Genotypes and frequencies of *kdr* mutation in molecular forms and in dead and alive *An. gambiae* to deltamethrin

Villages	Total	Species (Ag)	Molecular forms	kdr Genotypes			F (kdr)	Dead/Alive	kdr Genotypes			F (kdr)	p	
				RR	RS	SS			RR	RS	SS			
Itakpako	37	37	M	32	23	8	1	84.38	Dead	18	7	2	79.63 ^b	0.74
			S	5	2	2	1	60						
			M + S	37	25	10	2	81.08 ^a	Alive	7	3	0	85 ^b	
Itassoumba	30	30	M	30	21	9	0	85	Dead	15	8	0	82.61 ^c	0.43
			S	0	0	0	0	-						
			M + S	30	21	9	0	85 ^a	Alive	6	1	0	92.86 ^c	
Djohounkollé	43	43	M	37	22	15	0	79.73	Dead	20	14	0	79.41 ^d	0.89
			S	0	0	0	0	-						
			M + S	37	22	15	0	79.73 ^a	Alive	2	1	0	83.33 ^d	
Ko-Koumolou	38	38	M	36	27	8	1	86.11	Dead	29	8	1	86.84	
			S	2	2	0	0	100						
			M + S	38	29	8	1	86.84 ^a	Alive	-	-	-	-	

Ag: *An. gambiae*; ^{a, b, c, d}kdr frequencies with the same superscript are statistically similar ($p > 0.05$).

where their breeding sites are permanent. This condition was the same in our study area.

The recorded aggressive densities of mosquitoes are significantly different ($P < 0.05$) between Itassoumba and the three other villages. We recorded higher mosquito density in Itassoumba during the twelve months of the study in the dry season and the rainy season, compared to the three other villages where the mosquito density was very low regardless of the season. A similar result was reported by Akogb  to [4] and Akogb  to et al. [31], which showed that malaria transmission depends on ecological features. The higher *An. gambiae* s.s. density observed in Itassoumba is justified by the presence and the maintenance of fishponds basins which constitutes breeding sites for the development of aquatic stages of mosquitoes during all year round. However, the predatory behavior of fishes in the breeding sites was not observed as expected. Instead *An. gambiae* larvae compete with the fishes for provender thrown on the surface of water. According to Protopopoff et al., [32], the *Anopheles* density is higher in localities at the water edges than in those that are distant. The dynamics of *Anopheles* populations is in connection with the presence of the mosquito breeding sites and their productivity. Compared to Itassoumba, the low aggressive densities recorded throughout the year in Itakpako, Ko-Koumolou and Djohounkollé were due to low availability of breeding sites in these villages. Moreover, the soils in these villages are of a sandy-clay type allowing a fast infiltration of water, justifying therefore the temporary mosquito breeding sites there.

The infectivity rates of the *Anopheles* are similar in the study villages, except in Ko-Koumolou where the sporozoitic index is significantly higher. However, the number of *An. gambiae* analyzed by ELISA was very low: only 17 mosquitoes of which 5 were positive; that does not allow a valid conclusion. Despite the higher *Anopheles* density recorded in Itassoumba, the sporozoitic index was as high as that observed in Itakpako, Djohounkollé. As a result of this higher density, *An. gambiae* has maintained a closer contact with their host, which suggests the idea of precariousness and the decrease of the effectiveness of the distributed LLINs in Itassoumba. In Itassoumba, the relatively high sporozoitic index associated with a higher biting rate led to an extremely higher transmission of about 1159.62 infective bites of *An. gambiae* per man per year, roughly 3 infective bites per man per night. This rate was never recorded in Benin.

The spatial heterogeneity of the EIR reveals the importance of the local conditions on the intensity of malaria transmission which is an environmental problem [4].

Moreover, Yadouléton et al. [11] found an EIR of 168.18 infective bites/man/year in households close to market gardens of Hou  yilo in southern Benin. There is a significant difference between this EIR and that of Itassoumba (1159.62 infective bites/man/year) ($p < 0.0001$). This result

clearly shows that the combination of the fishponds with the market gardening has a significant impact on malaria parasite transmission.

A survey carried out in the market-gardening areas of Itassoumba, revealed that the farmers do not use the agricultural insecticides because of the intoxication risk of the fishes which are in the breeding basins. The other three villages are also characterized by a traditional agriculture practice which does not require the use of insecticides. The resistance observed in these localities could be explained by the use of the repellents and the LLINs in the households to fight mosquitoes. According to Protopopoff et al. [33], the selection of pyrethroids resistance in malaria vectors is due to the extensive use of LLINs. The same observation had been reported in Niger at the time of the implementation of a large scale national campaign distribution of LLINs to the whole population [34]. It is also possible that the emergence of resistance to pyrethroids in the four villages could be a consequence of several other factors (streaming of water with insecticide particles coming from the north of the country where pesticides are used massively against cotton pests etc.) other than the LLINs distributed across the country [35]. Under these conditions, the uncontrolled use of insecticides becomes a serious problem for public health. In permanent contact with insecticides, the populations of *An. gambiae* develop resistance toward these insecticides under several mechanisms. Thus, in our study, the *kdr* (Leu-Phe) mutation was investigated as the main mechanism involved in this resistance. This resistance is explained by the replacement of an amino acid by another, primarily the replacement of leucine by phenylalanine in West Africa (*kdr* Leu-Phe). This mutation was found in the two molecular forms M and S of *An. gambiae* s.s. This result is similar to that obtained by Dabiré et al. [36], which investigated the presence of the *kdr* mutation in the molecular forms M and S of *An. gambiae* in Bissau (capital of the Republic of Guinea Bissau). In addition, the similar *kdr* frequency recorded from dead and alive *An. gambiae* mosquitoes to deltamethrin in Itakpako, Itassoumba and Djohounkollé suggests the involvement of other resistance mechanisms to pyrethroids in addition to the *kdr*.

It is possible that an over expression of *CYP6M2* and *CYP6P3* genes, involved in the metabolism of the pyrethroids could also be implicated in this resistance. But our study did not explore this track. This phenomenon was carried out by Djouaka et al. [37] in the resistant populations of *An. gambiae* from Porto Novo (Capital of Benin).

Conclusion

The present study has confirmed the heterogeneous character of malaria epidemiology. The four villages of the districts of Ifangni and Sakété, in spite of their proximity

within a 15 kilometers radius, do not have the same level of transmission. The creation of fishponds and the regional market-gardening development in Itassoumba have caused a proliferation of *Anopheles*, especially *An. gambiae*. This proliferation is due to the presence of fishponds and water reserves (for watering vegetables), which also serves as breeding sites of *An. gambiae*. Owing to the permanent presence of these artificial *An. gambiae* breeding sites, the mosquito biting rates are very high in Itassoumba. In the villages located far from the agricultural development area, the *An. gambiae* breeding sites are formed only during the rainy season and the mosquito biting rates are very low with a ratio of 1 bite per man per year against 100 bites for the same period in Itassoumba. These results show that the land use can increase the level of malaria transmission. The case of Itassoumba is impressive: 9.62 to 21.65 infected bites of *An. gambiae* per human per year in Djohounkollé, Itakpako and Ko-Koumolou against 1159.62 in Itassoumba. It is also important to think about a strategy for managing resistance observed in the study villages because this could be a serious obstacle to the LLINs effectiveness.

Considering the very high level of transmission observed in Itassoumba, it is preferable that, the populations sleep under LLINs to avoid mosquito bites. We recommend that the human dwellings be located far from these agricultural activities in order to avoid the proximity of the populations to the mosquito breeding sites. It is also important to target the exact areas where high transmission is persisting such as Itassoumba so that the control operations can be more prioritized and focused in these areas.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AS, RG, FT, MO and MA conceived the study. AS, RG, MA and AM have participated in the design of the study. AS, ASS, HH, RO, RA and FA carried out the field activities and the laboratory analyses. VG has contributed to the mapping. AS, CA and MA drafted the manuscript. AS, RG, FT, RA, DG and AM critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to the Bill & Melinda Gates Foundation which financially supported this study. We thank Frederic Oké-Agbo for statistical analysis. The authors would also like to thank the populations of Itakpako, Itassoumba, Ko-Koumolou and Djohounkollé for their collaboration. Arthur Sovi obtained financial support for his doctoral training from Ministry of the Higher Education and of Scientific Research.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou 06 BP 2604, Benin.

²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Cotonou 01 BP 4521, Bénin. ³Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme, Cotonou, Benin. ⁴World Health Organisation, Cotonou, Benin.

⁵Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin. ⁶School of Public Health, University of Colorado, Denver, USA.

Received: 19 October 2013 Accepted: 8 December 2013

Published: 12 December 2013

References

- Carnevale P, Robert V, Molez JF, Baudon D: *Epidémiologie générale: faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique subsaharienne*. *Etudes médicales* 1984, **3**:123–133.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Ravaonjanahary C, Richard A, Robert V: *Typologie du paludisme en Afrique*. *Cahiers Santé* 1993, **3**:320–338.
- Fontenille D, Lepers JP, Campbell GH, Coluzzi M, Rakotoarivony I, Coulanges P: *Malaria transmission and vector biology in Manarintsoa, high plateaux of Madagascar*. *Am J Trop Med Hyg* 1990, **43**(2):107–115.
- Akogbeto M: *Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin*. Thèse de Doctorat ès-sciences: Université de Paris XI; 1992.
- Doannio JMC, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibe ME, Chauvancy G, Chandre F, Riviere F, Carnevale P: *La dynamique de la transmission du paludisme à Kafiné, un village rizicole en zone de savane humide de Côte d'Ivoire*. *Bull Soc Pathol Exot* 2002, **95**:11–16.
- Koudou BG, Tano Y, Doumbia M, Nsanzeana C, Cissé G, Girardin O, Dao D, N'goran EK, Vounatsou P, Bordmann G, Keiser J, Tanner M, Utzinger J: *Malaria transmission dynamics in central Côte d'Ivoire: the influence of changing patterns of irrigated rice agriculture*. *Med Vet Entomol* 2005, **19**:27–37.
- Meunier JY, Safeukui I, Fontenille D, Boudin C: *Etude de la transmission du paludisme dans une future zone d'essai vaccinal en forêt équatoriale du sud Cameroun*. *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **92**:309–312.
- Keiser J, Castro M, Maltese M, Bos R, Tanner M: *Effect of irrigation and large dams on the burden of malaria on a global and regional scale*. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:392–406.
- Manga L, Bouchite B, Toto JC, Fromont A: *La faune anophélienne et la transmission du paludisme dans une zone de transition forêt-savane au centre du Cameroun*. *Entomol médicale* 1997, **91**:4–9.
- Klinkenberg E, McCall PJ, Michael DW, Amerasinghe FP, Donnelly MJ: *Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana*. *Malar J* 2008, **7**:151.
- Yadouleton A, N'Guessan R, Allagbé H, Asidi A, Boko M, Osse R, Padonou G, Gazard K, Akogbeto M: *The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin*. *Parasit Vectors* 2010, **3**:118.
- Carnevale P, Guillet P, Robert V, Fontenille D, Doannio J: *Diversity of malaria in rice growing areas of Afro-tropical region*. *Parassitologia* 1999, **41**:273–276.
- Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbeto MC: *Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in population of *An. gambiae* in urban areas of Benin*. *Malar J* 2009, **8**:103.
- Akogbeto MC, Djouaka R, Noukpo H: *Use of agricultural insecticides in Benin*. *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**:400–405.
- Padonou G, Sezonlin M, Gbedjissi G, Ayi I, Azondekon R, Djenontin A, Bio-Bangana S, Oussou 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**:59–68.
- Akogbeto MC, Djouaka RF, Kindé-Gazard DA: *Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings*. *Malar J* 2006, **5**:22.
- Ministère de la Santé: *Annuaire des statistiques sanitaires 2011*. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2012.
- Ministère de la Santé: *Annuaire des statistiques sanitaires 2012*. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2013.
- Gillies M, De Meillon B: *The Anophelinae of Africa south of the Sahara*. *Publ South Afr Inst Med Res* 1968, **54**:343.
- WHO: *Recommandations de la consultation technique sur la lutte contre les vecteurs du paludisme dans la Région africaine de l'OMS*. Brazaville: Congo/ Rapport technique de l'OMS; 2011:2.
- Burkot TR, Williams JL, Schneider I: *Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown in vitro from the same isolate*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984, **78**:339–341.
- Lombardi, Esposito, Zavala F, Lamizana L, Rossip, Saba-Tinelli G, Nussenweig S, Coluzzi M: *Detection and anatomical localisation of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and sporozoites in the Afrotropical 1 malaria vector *Anopheles gambiae* s.l*. *Am J Trop Med Hyg* 1987, **37**:491–494.
- Scott J, Brogdon W, Collins F: *Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction*. *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520–529.
- 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.
- 25. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Bergé J, Devonshire A, 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.
 - 26. R Development Core Team: *A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011. URL <http://www.r-project.org/>. ISBN 3-900051-07-0.
 - 27. Huttel J: Note sur la répartition des moustiques dans le Bas-Dahomey. *Bull Soc Path Exot* 1950, **43**:563–566.
 - 28. Irving-Bell RJ, Inyang EN, Tamu G: Survival of *Aedes vittatus* (Diptera: Culicidae) eggs in hot, dry rockpools. *Trop Med Parasitol* 1991, **42**(1):63–66.
 - 29. Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA: Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979, **73**:483–497.
 - 30. De Souza D, Kelly-Hope L, Lawson B, Wilson M, Boakye D: Environmental Factors Associated with the Distribution of *Anopheles gambiae* s.s. in Ghana; an Important Vector of Lymphatic Filariasis and Malaria. *PLoS ONE* 2010, **5**:9927. 5.
 - 31. Akogbeto MC, 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**:586–593.
 - 32. Popoff N, Van Bortel W, CSPEYBROECK N, Van Geertruyden JP, Baza D, D'Alessandro U, Coosemans M: Ranking malaria risk factors to guide malaria control efforts in African highlands. *PLoS ONE* 2009, **4**:8022.
 - 33. Popoff 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.
 - 34. 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.
 - 35. Padonou G, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbétó M: 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. *Parasit Vectors* 2012, **5**:72.
 - 36. Dabiré KR, Diabaté A, Agostinho F, Alves F, Manga L, Faye O, Baldet T: Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (*kdr*) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bull Soc Path Exot* 2008, **101**(2):119–123.
 - 37. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 2008, **9**:538.

doi:10.1186/1756-3305-6-352

Cite this article as: Sovi et al.: Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasites & Vectors* 2013 6:352.

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





RESEARCH

Open Access

Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas

Arthur Sovi^{1,2*}, Roseric Azondékon⁴, Rock Y Aïkpon^{1,2}, Renaud Govoétchan^{1,2}, Filémon Tokponnon^{2,3}, Fiacre Agossa¹, Albert S Salako¹, Frédéric Oké-Agbo¹, Bruno Aholoukpè³, Mariam Okè³, Dina Gbénou⁵, Achille Massougbedjji⁵ and Martin Akogbéto^{1,2}

Abstract

Background: A dynamic study on the transmission of malaria was conducted in two areas (R^+ area: Low resistance area; R^{++} area: High resistance area) in the department of Plateau in South Eastern Benin, where the population is protected by Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). The aim of this study was to determine if the resistance of malaria vectors to insecticides has an impact on their behavior and on the effectiveness of LLINs in the reduction of malaria transmission.

Methods: Populations of *Anopheles gambiae* s.l. were sampled monthly by human landing catch in the two areas to evaluate human biting rates (HBR). Collected mosquitoes were identified morphologically and female *Anopheles* mosquitoes were tested for the presence of *Plasmodium falciparum* antigen as assessed using ELISA. The entomological inoculation rate (EIR) was also calculated ($EIR = HBR \times$ sporozoitic index [S]). We estimated the parity rate by dissecting the females of *An. gambiae*. Finally, window catch and spray catch were conducted in order to assess the blood feeding rate and the exophily rate of vectors.

Results: After 6 months of tracking the mosquito's behavior in contact with the LLINs (Olyset) in R^{++} and R^+ areas, the entomological indicators of the transmission of malaria (parity rate and sporozoitic index) were similar in the two areas. Also, *An. gambiae* populations showed the same susceptibility to *P. falciparum* in both R^+ and R^{++} areas. The EIR and the exophily rate are higher in R^+ area than in R^{++} area. But the blood-feeding rate is lower in R^+ area comparing to R^{++} .

Conclusion: The highest entomological inoculation rate observed in R^+ area is mostly due to the strong aggressive density of *An. gambiae* recorded in one of the study localities. On the other hand, the highest exophily rate and the low blood-feeding rate recorded in R^+ area compared to R^{++} area are not due to the resistance status of *An. gambiae*, but due to the differences in distribution and availability of breeding sites for *Anopheles* mosquitoes between areas. However, this phenomenon is not related to the resistance status, but is related to the environment instead.

Keywords: Resistance, LLINs, *An. gambiae*, Impact, Transmission, Behavior, Benin

* Correspondence: sart52005@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou 06 BP 2604, Benin

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

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

Open Access

RESEARCH PAPER

Comparative study of the effectiveness of combination therapies based on atemisinine in Dassa Zounme and Parakou: case of *Artemether lumefantrine* and *Artesunate amodiaquine*

Yves Eric Denon*, Yolande Sissinto, Filémon Tokponnon, Mariam Oke, Dorothée Kinde Gazard, Hortense Kossou, Dina Gbenou, Achille Massougbedji, Frederick Loko

National Malaria Control Program, Ministry of Health (1); 01BP6974 Cotonou, Bénin

Keywords therapeutic efficacy, Artemether-lumefantrine, Artesunate-amodiaquine, parasitologic clairance, apyrexy.

Publication date: March 09, 2014

Abstract

The National Malaria Control Program recommended in 1993, the use of Chloroquina (CQ) as first line drug for malaria treatment, and sulfadoxin pyrimethamin as second drug. After years, Benin knows resistance about these antimalarials. Quinina was to treat gravities. In 2004, the strategy of treatment changed. Treatment of malaria cases is based on use of artemisinina therapeutic combination. The goal of this study is to be sure that these drugs are efficace before general use in the country and in some regions as Dassa Zounmè where the resistance is up (61. 3% for Chloroquina CQ and 45.9% for SP in 2002).The study is based on: comparison of therapeutic efficacy of artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine. Results show that all of the tested drugs have good therapeutic efficacy. Most important rate failure is in Dassa Zounmè (33, 86%) than Parakou (23, 44%). They are parasitologic failure and are probably due to the reinfestation of children. Two drugs have a good parasitological clearance and eliminate fever after 2 days of treatment.

Abbreviations

ACPR: Adequate Clinical and Parasitological Response

LPF: Late Parasitological Failure

ETF: Early Therapeutic Failure

LCF: Late Clinique Failure

NMCP: National Malaria Control Program

Scientific names

Plasmodium falciparum ; *Plasmodium malariae* ; *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium ovale* ; *Anopheles gambiae* ; Artemether lumefantrine ; Artesunate Amodiaquine ; Sulfadoxine - Pyriméthamine

*Corresponding Author: Yves Eric Denon ✉ denric2000@yahoo.fr

RESEARCH

Open Access

Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC Indoor Residual Spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa

Rock Aïkpon^{1,2*}, Michel Sèzonlin², Filémon Tokponon³, Mariam Okè³, Olivier Oussou¹, Frédéric Oké-Agbo¹, Raymond Beach⁴ and Martin Akogbèto^{1,2}

Abstract

Background: The National Malaria Control Program (NMCP) has been using pirimiphos methyl for the first time for indoor residual spraying (IRS) in Benin. The first round was a success with a significant decrease of entomological indicators of malaria transmission in the treated districts. We present the results of the entomological impact on malaria transmission. Entomologic parameters in the control area were compared with those in intervention sites.

Methods: Mosquito collections were carried out in three districts in the Atacora-Dongo region of which two were treated with pirimiphos methyl (Actellic 50EC) (Tanguiéta and Kouandé) and the untreated (Copargo) served as control. *Anopheles gambiae* s.l. populations were sampled monthly by human landing catch. In addition, window exit traps and pyrethrum spray catches were performed to assess exophagic behavior of *Anopheles* vectors. In the three districts, mosquito collections were organized to follow the impact of pirimiphos methyl IRS on malaria transmission and possible changes in the behavior of mosquitoes. The residual activity of pirimiphos methyl in the treated walls was also assessed using WHO bioassay test.

Results: A significant reduction (94.25%) in human biting rate was recorded in treated districts where an inhabitant received less than 1 bite of *An. gambiae* per night. During this same time, the entomological inoculation rate (EIR) dramatically declined in the treated area (99.24% reduction). We also noted a significant reduction in longevity of the vectors and an increase in exophily induced by pirimiphos methyl on *An. gambiae*. However, no significant impact was found on the blood feeding rate. Otherwise, the low residual activity of Actellic 50 EC, which is three months, is a disadvantage.

Conclusion: Pirimiphos methyl was found to be effective for IRS in Benin. However, because of the low persistence of Actellic 50EC used in this study on the treated walls, the recourse to another more residual formulation of pirimiphos methyl is required.

Keywords: IRS, Pirimiphos methyl, Efficacy, Malaria, Benin

Background

Malaria is a major public health problem and *Anopheles gambiae* is one of the major vectors of this disease in sub-Saharan Africa [1]. The current effective vector control tools include the use of Long Lasting Insecticide Nets (LLIN) and Indoor Residual Spraying (IRS) [2]. In

sub-Saharan Africa and southern Asia, these two methods have shown good results [3,4] but they have their drawbacks.

The main problem with ITNs and IRS is the development of insecticide resistance, particularly pyrethroid-resistance, which has been demonstrated in several populations of *Anopheles gambiae* [5-8]. 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 [5], Kenya [9], Benin [10,11], Niger [12], Burkina

* Correspondence: rockypremier@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604
Cotonou, Bénin

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

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

Annexes 2 : Protocoles

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

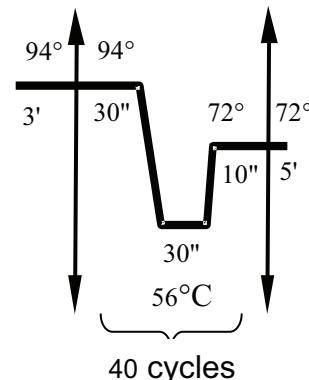
Conditions PCR

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 : ACCAAGATGGTCGTTGC

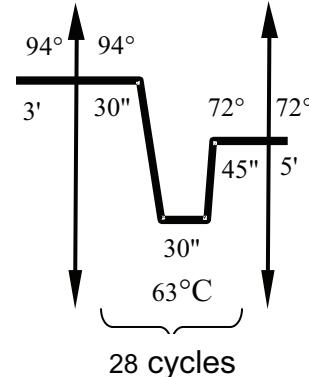
Conditions PCR

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

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
MgCl ₂ 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 AATTTCGATTACTTACGACA
 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

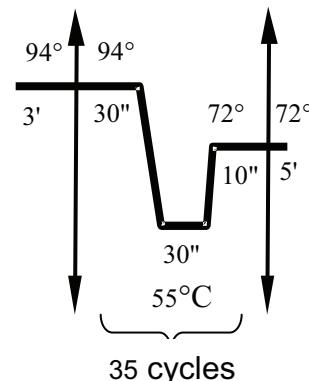
D1/D2 : 293 bp

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

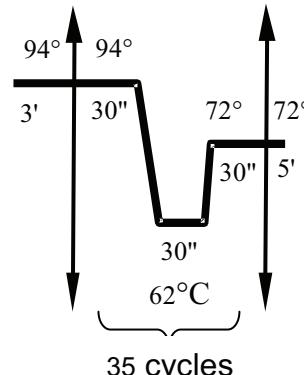
Conditions PCR

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

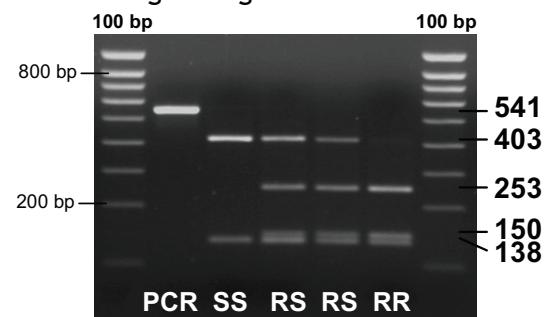
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH ₂ O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

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 138 bp	253 bp 150 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 à tester ($n \times 50 \mu\text{l}$)
 * monospécifique : uniquement du plasmodium étudié ($1 \times 50 \mu\text{l}$)
 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</i> 210 :	5 µl/5 ml PBS
<i>p. vivax</i> 247 :	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 peroxidase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB)
P. vivax -210 peroxidase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB)
P. vivax -247 peroxidase = 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</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

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 lyophilisa 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 Témoin pos	20µl de II	1000µl BB	100pg
<i>P. vivax</i> 210	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 Témoin pos	200µl de C	800µl BB	40pg
<i>P. vivax</i> 247	Stock	Pv247 lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist	----
	1	5µl de stock	500µl BB	500ng
	2	40µl de 1	1000µl BB	20ng
	3 Témoin pos	100µl de 2	700µl BB	2.5ng

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

**ENQUETE PALUDOMETRIQUE TRANSVERSALE DE L'AN 5 DU PROJET
« IMPACT DE LA RESISTANCE DU VECTEUR AUX INSECTICIDES
SUR L'EFFICACITE DES MIILD » AU BENIN**

QUESTIONNAIRE MENAGE »

NUMERO DE LA FICHE (CODE MENAGE) _____

DEPARTEMENT _____ *ZONE SANITAIRE* _____

CLUSTER (QUARTIER/VILLAGE) (cf code) _____

DATE _____

NOM DU CHEF MENAGE _____

NIVEAU D'INSTRUCTION DU CHEF MENAGE

1= Jamais été à l'école, 2= Primaire, 3= post primaire /____/____/

NOMBRE DE PERSONNES DANS LE MENAGE (Non compris les visiteurs) /____/____/

ENQUETEUR _____

SUPERVISEUR _____

RESULTAT DE LA COLLECTE

1 = Enquête complète (Toutes les sections renseignées) /____/____/

2 = Enquête incomplète (Une ou plusieurs sections non renseignées) /____/____/

RAISON DE NON-REONSE

1=Refus 2=Absence 3=Incapacité /____/____/

APPRECIATION DE LA QUALITE DE L'ENQUETE

1=Très bonne 2=Bonne 3=Moyenne 4=Mauvaise 5=Très Mauvaise /____/____/

MODULE 1 : CARACTERISTIQUES DU LOGEMENT

Maintenant nous voudrions avoir des informations sur votre logement.

	1 - CARACTERISTIQUES DU LOGEMENT (Encerclez d'abord le code correspondant à la réponse de l'enquêté, puis reportez-le dans le bac prévu à cet effet)			
Q01	A. Quel est le nombre total de pièces de votre logement ?			
	B. Combien de pièces utilisez-vous habituellement pour dormir ?			
Q02	Quel est votre principal mode d'approvisionnement en eau de boisson ?	1= robinet individuel 2=robinet collectif 3=revendeur d'eau de robinet 4= borne fontaine publique 5= forage 6= puits à pompe	7= puits/ source aménagée 8= Puits /Rivière/Lac/ Marigot /Source fontaine publique non aménagé(e) 9= Eau de pluie 10= eau minérale 11= autre à préciser	/___/
Q03	Quel est le principal matériau des murs de votre logement ?	1=Béton/Parpaing/Briques cuites 2=Pierre de taille 3=Planche 4=Carabot	5=Terre/Brique simple 6=Pise/terre battue 7= Nattes/Chaume/Feuille 8=Autre (à préciser..)	/___/
Q04	Quel est le principal matériau du toit de votre logement ?	1=Ciment 2=Tôle/Tuile 3=Nattes /Chaume/Feuille	4=Terre 5=Autre (à préciser)	/___/
Q5	Quel est le principal matériau du sol de votre logement ?	1=Ciment 2=Carreaux 3=Bois	4=Terre 5=Autre (à préciser....).....	/___/

MODULE 2 : COMPOSITION DU MENAGE

Je vais vous demander les noms et prénoms de tous les membres du ménage, en commençant par le chef de ménage et vous poser quelques questions concernant chaque membre.

	<i>Q6</i>	<i>Q7</i>	<i>Q8</i>	<i>Q9</i>	<i>Q10</i>	<i>Q11</i>
N°	<i>Noms et prénoms des membres du ménage</i>	<i>Quel est le lien de parenté de (Nom) avec le Chef de Ménage ? CF CODES</i>	<i>(Nom) est de quel sexe ? 1=Masculin 2=Féminin</i>	<i>Quel est l'âge de (Nom) ? Inscrivez l'âge en années révolues. 98 pour NSP) En mois pour les enfants de moins d'un an</i>	<i>Est-ce que (Nom) vit habituellement dans ce village/ quartier? 1 = Oui 2 = Non</i>	<i>Antécédents de température dans les 48 h ou dans les deux semaines si enfants de moins de 10 ans</i>
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
		/ / /	/ /	/ / /	/ /	/ / / /
						/ / / /

CODES POUR Q7: LIEN DE PARENTÉ AVEC LE CHEF DE MÉNAGE

CHEF DE MÉNAGE01
FEMME OU MARI02
FILS OU FILLE.....	.03
GENDRE OU BELLE-FILLE04
PETIT-FILS/FILLE05

PÈRE/MÈRE06
BEAU-PÈRE/BELLE-MÈRE07
FRÈRE OU SŒUR08
NIÉCE/NEVEU DIRECT09
NIÉCE/NEVEU PAR ALLIANCE.....	.10

AUTRES PARENTS11
ADOPTÉ/EN GARDE/ENFANT DE LA FEMME/MARI.....	.12
SANS PARENTÉ13
NE SAIT PAS98

MODULE 3 : POSSESSION DES MOUSTIQUAIRES

Maintenant nous voudrions avoir des informations sur l'achat, la possession et l'utilisation des moustiquaires de votre ménage

No	Questions et Filtres	Reponses	Code
Q12	Avez-vous une moustiquaire dans cette maison installée et utilisée par les membres du ménage? (Si oui aller à Q19)	1. Oui 2. Non	____
	Tous les membres du ménage ont-ils une moustiquaire ?	1. Oui 2. Non	____
Q13	Si non, pourquoi n'avez-vous pas de moustiquaire dans votre maison? (ALLER AU MODULE 5)	1. Je n'ai pas les moyens (financiers) 2. Ce n'est pas nécessaire 3. J'utilise autre chose 4. Il n'y a pas beaucoup de moustiques ici 5. Je n'aime pas la moustiquaire 6. Par oubli 7. Autres (à préciser)	____
Q14	Si oui, est- ce que les membres de votre ménage dorment sous une moustiquaire de manière continue pendant toute l'année?	1. Oui 2. Non 9. Ne sais pas	____
Q15	Combien de moustiquaires y a-t-il dans votre maison ?		____ ____

MODULE 4 : POSSESSION ET UTILISATIONS DES MOUSTIQUAIRES

		Moustiquaire 1	Moustiquaire 2	Moustiquaire 3	Moustiquaire 4	Moustiquaire 5	Moustiquaire 6
<i>Q16</i>	Demander à l'enquêté à voir les moustiquaires du ménage 1. VUE 2. Non VUE	<input type="checkbox"/>					
<i>Q17</i>	Depuis combien de mois votre ménage a t-il cette moustiquaire?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>					
<i>Q18</i>	Comment avez-vous obtenu cette moustiquaire ? 1. Achat 2. MINSANTE 3. don d'une ONG 4. Famille/ami 5. Autre 9. Ne Sait Pas	<input type="checkbox"/>					
<i>Q19</i>	Cette moustiquaire est de quelle marque ? 1. Permanet 2. Olyset 3. Autre MILDA 4. Moustiquaire non traitée 9. Ne sait pas	<input type="checkbox"/>					
<i>Q20</i>	Est ce que la nuit dernière, quelqu'un a dormi sous cette moustiquaire? 1. Oui 2. Non 9. NSP	<input type="checkbox"/>					
<i>Q21</i>	SI oui, qui a dormi sous cette moustiquaire la nuit dernière ? (<i>Noter le code des personnes à partir du tableau ménage dans le bac et remplir le module utilisation des moustiquaires</i>)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>					
<i>Q22</i>	Cette moustiquaire a-t-elle des trous ? 1. Oui → Aller à Q29, Q30 et Q31 2. Non } Aller au Module 5 9. Ne Sait Pas	<input type="checkbox"/>					
<i>Q23</i>	Nombre de trous pouvant laisser passer un doigt de la main	<input type="checkbox"/>					
<i>Q24</i>	Nombre de trous pouvant laisser passer un poing (main fermée)	<input type="checkbox"/>					
<i>Q25</i>	Nombre de trous pouvant laisser passer la tête d'une personne	<input type="checkbox"/>					

MODULE 5 : EXAMEN PHYSIQUE ET BILAN BIOLOGIQUE DU PALUDISME POUR LES ENFANTS DE MOINS DE 10 ANS DANS LE MENAGE

Code ménage	Code enfant	Nom et prénom	Age (Mois)	Sexe (M/F)	Température (°C)	Etat des conjonctives	TDR			ACT (O/N)	Parasites		
							(O=Oui N=Non R=Refus)	Résultat			P.falciparum	P. ovale	Charge parasitaire
								Pf	pan				
							Positif						
							Négatif						
							Invalidé						
								Pf	pan				
							Positif						
							Négatif						
							Invalidé						
								Pf	pan				
							Positif						
							Négatif						
							Invalidé						
								Pf	pan				
							Positif						
							Négatif						
							Invalidé						
								Pf	pan				
							Positif						
							Négatif						
							Invalidé						
								Pf	pan				
							Positif						
							Négatif						
							Invalidé						

Abstract

In this study, we analyzed how vector resistance to insecticides affects the efficacy of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). This evaluation compared the epidemiological indicators of malaria in two areas: an area where *Anopheles* malaria vectors were resistant to pyrethroids and an area where these mosquitoes were susceptible to these products (control area). We conducted susceptibility bioassays where we exposed wild mosquitoes collected from the study sites to deltamethrin. The bioassay results did not allow us to identify an area where *Anopheles* was fully susceptible to pyrethroids, and so to make progress, we had to carry out the study under two different settings. One was a low resistance area (R+ area) and the other was high resistance (R+++ area) of *Anopheles* mosquitoes to pyrethroids. The study was implemented in the districts of Ifangni, Sakété, Pobè and Kétou in the Plateau department of Benin.

After ensuring that the populations of both areas had the same characteristics in terms of frequency of use and coverage of LLINs, the effectiveness of nets was measured by taking into account several indicators:

- The entomological inoculation rate of *An. gambiae*.
- The protective efficacy of LLINs as determined by analyzing the presence or absence of a fever in children, and by quantifying specific anti-saliva antibody present upon exposure to infected mosquitoes (case-control study), and in the community (transversal and longitudinal surveys of a cohort of children under 5 years).
- The prevalence of malaria infection and anemia
- The parasite densities and the evolution of monthly incidences of malaria.

Entomological, clinical-parasite and immunological indicators of malaria transmission were compared between R+ and R+++ areas and correlated to the levels of vector resistance to deltamethrin.

The results indicated that there was no evident relationship between epidemiological parameters measured and the level of vector resistance in both areas. Our initial hypothesis stated that vector resistance to insecticides would be a limit to the effectiveness of LLINs. However, according to our results, no significant differences were noted between the infectivity rate of *Anopheles* with *P. falciparum* and parturition rate in R+ and R+++ areas. Similarly, the biting rate and the entomological inoculation rate (EIR) were different from one district to another as well as in R+ area and R+++ area. Median levels of specific IgG amongst children showed a strong heterogeneous similarity in R+ and R+++ areas well as among people who did or did not use LLINs. The use of LLINs was closely associated with a reduction in the prevalence of malaria and anemia regardless of resistance level. However, in R+ areas, the incidence of malaria (disease and infestation) was low compared to R+++ areas. Low correlations were observed between the incidences of malaria and mortality rates to deltamethrin in R+ and R+++ areas. The protective efficacy was 55% in R+ area whereas the probability of having malaria was 13% higher in R+++ area than in R+ area. The lack of a clear difference recorded between the epidemiological indicators in both areas was probably due to the fact that there was no area where vectors were fully susceptible. Moreover the parameters involved in the entomological malaria transmission were more influenced by some environmental confounding factors (disparity in the availability and distribution of *Anopheles* breeding sites and availability of permanent or semi-permanent breeding sites) and human behaviors (extent of LLINs use and durability) that must be tracked in time.

Keywords: Resistance, Protective Efficacy of LLINs, Transmission, Prevalence, Incidence, Parasite density, Malaria, Plateau, Benin

RESUME

Dans la présente thèse, nous avons étudié l'impact de la résistance des vecteurs aux insecticides sur l'efficacité des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'action (MILD). L'étude a pour but de comparer les indicateurs épidémiologiques du paludisme dans deux zones : une zone où les anophèles vecteurs du paludisme sont résistants aux pyréthrinoïdes et une zone où ces moustiques sont sensibles à ces produits (zone témoin). Mais à défaut de l'existence d'une zone de franche sensibilité, l'étude a été réalisée dans deux groupes de localités : les unes de faible résistance appelées localités R+ et les autres de forte résistance appelées localités R+++. Les deux groupes de localités ont été identifiées après des tests de sensibilité d'*An. gambiae* à la deltaméthrine. L'étude a été réalisée dans le département du Plateau, au Bénin, précisément dans les communes de Ifangni, Sakété, Pobè et Kétou.

Après s'être assuré que les populations des deux groupes de localités R+ et R++ présentent les mêmes caractéristiques du point de vue du taux de couverture et d'utilisation des MIILDS, l'efficacité des moustiquaires a été mesurée en prenant en compte plusieurs indicateurs :

- le taux d'inoculation entomologique chez *An. gambiae*,
- l'efficacité protectrice des MIILDS déterminée en milieux de soins chez des enfants vus avec ou sans fièvre et à travers le dosage des anticorps spécifiques anti-salivaires d'exposition aux piqûres de moustiques infestés (étude cas-témoins), et en communauté (enquêtes transversale et longitudinale d'une cohorte d'enfants de moins de 5 ans).
- la prévalence de l'infestation palustre et de l'anémie
- les densités parasitaires et l'évolution des incidences mensuelles du paludisme.

Les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme, parasito-cliniques, et immunologiques ont été comparés entre les deux zones R+ et R+++ puis corrélés avec les niveaux de résistance des vecteurs à la deltaméthrine.

Selon les résultats enregistrés, nous n'avons pas observé l'évidence d'une relation entre les paramètres épidémiologiques mesurés et le niveau de résistance dans les deux types de localités. Selon les hypothèses de départ, la résistance des vecteurs aux insecticides constituerait une limite à l'efficacité des moustiquaires imprégnées. Mais, aucune différence significative n'a été notée entre les taux d'infectivité des anophèles au *P. falciparum* et de parturé en R+ et R+++. De même, le taux de piqûre et le taux d'inoculation entomologique (TIE) sont différents d'une localité à l'autre aussi bien dans la zone R+ que dans la zone R+++. Les niveaux médians d'IgG spécifiques entre les enfants étaient similaires en zones R+ et R+++ de même que chez les utilisateurs ou non de MIILD avec une forte hétérogénéité. L'utilisation des MIILD a été fortement associée à une réduction de la prévalence du paludisme et de l'anémie indépendamment de la résistance.

Toutefois, dans les zones R+, l'incidence du paludisme (maladie et infestation) a été faible comparativement aux zones R+++ mais de faibles corrélations ont été observées entre les incidences du paludisme et les taux de mortalité à la deltaméthrine en R+ et R+++. L'efficacité protectrice a été de 55% en R+ alors qu'en R+++ la probabilité de faire le paludisme est plus élevée (+13%) que ceux qui sont en R+. L'absence de nette différence enregistrée entre les indicateurs épidémiologiques dans les deux zones est probablement due à l'inexistence de zones où les vecteurs sont franchement sensibles. De plus les paramètres impliqués dans la transmission entomologique du paludisme sont plus influencés par certains facteurs environnementaux de confusion qu'il faudra suivre parallèlement dans le temps (disparité dans la disponibilité et la distribution des gîtes d'anophèle, présence ou non de gîtes permanents ou semi-permanents) et de comportement des hommes (degré d'utilisation des MIILDS et leur état physique).

Mots clés: Résistance, Efficacité Protectrice des MIILD, Transmission, Prévalence, Incidence Densités Parasitaires, Paludisme, Plateau, Bénin